n° d'enregistrement
au C.N.R.S. :

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par Joël BOCKAERT

pour obtenir le grade de Docteur Es Sciences

Sujet de la Thèse: Les récepteurs moléculaires de l'hormone antidiurétique et leurs relations fonctionnelles avec l'adényl cyclase membranaire.

soutenue le: 23 juin 1973 devant la Commission d'Examen

M.M.	A. JOST	Président
	F. MOREL S. JARD	Examinateurs
	H. CLAUSER	Membre invité

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548022_0015

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Joël BOCKAERT

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : les récepteurs moléculaires de l'hormone antidiurétique et leurs relations fonctionnelles avec l'adényl cyclase membranaire.

Soutenue le : 23 juin 1973

devant la commission d'examen

MM.	A. JOST	Président
	F. MOREL	Examinateurs
	S. JARD	
	H. CLAUSER	Membre invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE PREMIER - METHODOLOGIE..... 7

A) Mesure de l'activité biologique des hormones neurohypophysaires..... 7

1) Sur l'épithélium isolé de la peau de grenouille. 7

2) Sur les structures membranaires isolées..... 14

B) Préparation d'ocytocine et de vasopressine tritiées. Mesure de la liaison entre ces hormones marquées et leurs sites de fixation cellulaires..... 19

1) Préparation des hormones neurohypophysaires tritiées..... 19

2) Mesure de la concentration du complexe hormone marquée-récepteur..... 27

CHAPITRE DEUXIEME - IDENTIFICATION DU RECEPTEUR MOLECULAIRE DE L'OCYTOCINE DES CELLULES EPITHELIALES DE LA PEAU ET DE LA VESSIE DES AMPHIBIENS..... 33

A) Introduction..... 33

B) Les récepteurs des hormones neurohypophysaires impliqués dans le transport actif de Na^+, ont été mis en évidence sur l'épithélium isolé de la peau de grenouille..... 35

1) Contrôles préliminaires..... 35

2) Mise en évidence des récepteurs spécifiques à l'ocytocine $\left[{}^3H\right]$ 37

Pages

3) Discussion..... 47

C) Mise en évidence des récepteurs à l'ocytocine impliqués dans l'activation de l'adényl cyclase..... 51

1) Définition des conditions optimales pour la mesure de l'activité adényl-cyclasique..... 51

2) Corrélations entre la fixation d'ocytocine $\left[^3H\right]$ sur les "ghosts" de cellules épithéliales de la vessie de grenouille et l'activation de l'adényl cyclase..... 57

D) Discussion 65

CHAPITRE TROISIEME - IDENTIFICATION DU RECEPTEUR MOLECULAIRE DE LA LYSINE-VASOPRESSINE DES MEMBRANES PLASMIQUES DE MEDULLA DE REIN DE PORC..... 69

A) Caractéristiques enzymatiques des membranes plasmiques.... 69

1) Membranes plasmiques purifiées..... 69

2) Membranes plasmiques partiellement purifiées..... 70

B) Caractéristiques cinétiques de la formation du complexe Hormone-récepteur..... 75

1) Modèle simple de l'intéraction entre l'hormone et son récepteur..... 75

2) Résultats..... 77

C) Spécificité des récepteurs de la L.V.P. $\left[^3H\right]$ 78

D) Discussion 83

Pages

CHAPITRE QUATRIEME - L'ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE EST FONCTION DE LA CONCENTRATION DU COMPLEXE "HORMONE-RECEPTEUR"..... 87

A) Théories pharmacologiques de l'activation..... 88

B) Applications de la théorie de l'occupation aux récepteurs rénaux de la lysine-vasopressine couplés à l'adényl cyclase..... 89

C) Non linéarité du couplage..... 94

1) Définition du "couplage" entre le récepteur et l'adényl cyclase..... 94

2) Résultats expérimentaux..... 97

D) Discussion et conclusion 99

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE..... 102

BIBLIOGRAPHIE..... 108

INTRODUCTION

Le rôle physiologique de l'hormone antidiurétique (ADH) sur le rein des mammifères est d'augmenter la perméabilité osmotique à l'eau des cellules épithéliales du tubule distal (1-2-3) et des canaux collecteurs du néphron (4). Il a été suggéré par MOREL (5) que l'hormone antidiurétique pourrait jouer un rôle dans la réabsorption active de sodium au niveau de la branche ascendante de l'anse de HENLE, contribuant ainsi à l'établissement du gradient de concentration cortico-médullaire. Cette double action, perméabilisation à l'eau (effet hydrosmotique) et stimulation du transport de sodium (effet natrifé-rique), les hormones neurohypophysaires l' exercent également au niveau du tubule rénal (6), de la peau (7) ou de la vessie (8) des amphibiens anoures. Dans l'ensemble de ces structures épithéliales, les mécanismes cellulaires d'action des hormones neurohypophysaires apparaissent similaires (9-10-11).

D'une part, il est généralement admis que la première étape de leur mécanisme d'action consiste en la reconnaissance du message hormonal grâce à l'intéraction de l'hormone "premier message" avec un nombre limité de sites récepteurs stéréospécifiques. Les récepteurs seraient localisés sur la membrane plasmique située au contact du milieu intérieur de l'animal, les hormones neurohypophysaires n'agissant pas lorsqu'on les ajoute du côté externe des cellules épithéliales,(12-13).

D'autre part, il est maintenant bien démontré que l'AMP cyclique est le "second messager" des actions hydrosmotiques et natrifériques des hormones neurohypophysaires, que ce soit sur les cellules épithéliales de la vessie (14) et de la peau (15-16) des amphibiens ou sur les cellules épithéliales du néphron des mammifères (17-18).

l'AMP cyclique est synthétisé à partir d'ATP par une enzyme essentiellement membranaire, l'adényl cyclase (19). La vasopressine

stimule l'activité adényl-cyclasique des fractions particulaires d'homogénats de rein, de chien (17), de rat (20-21-22-23-24), de souris (22), de lapin (25) et de porc (22) ou d'homogénats de la vessie des amphibiens (26-27). Une bonne corrélation a été établie entre les affinités d'une série d'analogues de l'hormone antidiurétique pour l'adényl cyclase de médullaire de rein de lapin, et leurs activités antidiurétiques respectives (25). En particulier, l'acide vasopressinoïque, inhibiteur de l'action antidiurétique de l'arginine vasopressine in-vivo, bloque l'activation de l'adényl cyclase médullaire (25).

Cette découverte est importante car la possibilité d'apprécier in-vitro une des toutes premières étapes du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires, ouvre la voie à une nouvelle approche de l'intéraction hormone récepteur sur des systèmes acellulaires. De plus, le fait que l'hormone modifie l'activité d'une enzyme membranaire constitue un argument supplémentaire en faveur d'une localisation membranaire de récepteur. Les mécanismes par lesquels l'AMP cyclique entraîne une stimulation du transport actif de sodium et une agumentation de la perméabilité à l'eau des cellules épithéliales restent encore à définir. Il est possible qu'ils impliquent la phosphorylation d'une (ou plusieurs) protéines. En effet, une protéine kinase activable par l'AMP cyclique a été mise en évidence dans les cellules épithéliales de la vessie des amphibiens (28-29) et du rein des mammifères (30).

D'un point de vue fonctionnel et expérimental il peut être utile de diviser l'ensemble des éléments du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires en deux étapes principales:

1°) l'intéraction hormone-récepteur et les phénomènes qui conduisent de cette intéraction à l'activation de l'adényl cyclase

2°) le mode d'action de l'AMP cyclique

Le but de notre travail est d'étudier la première de ces étapes.

Deux méthodes d'étude de l'intéraction hormone-récepteur avaient été largement exploitées lorsque nous avons abordé ce problème.

L'une d'elle consistait en une analyse précise des relations existant entre l'intensité de la réponse biologique finale prise comme index de l'intéraction hormone-récepteur, et la concentration de l'hormone libre au contact de la préparation (voir par exemple Edelman et al 1964 (31) ; Jard et al 1968 (32)).

L'autre consistait en une recherche des relations entre l'activité biologique et la structure primaire d'une série d'analogues des hormones neurohypophysaires. La découverte d'inhibiteurs compétitifs parmi les analogues naturels (6-33) ou artificiels (34-35) des hormones neurohypophysaires, capables de se fixer sur les récepteurs mais incapables de produire un effet biologique détectable, est incontestablement le résultat le plus important que cette méthode d'analyse ait permis d'obtenir. Il montre en effet une dissociation possible des caractéristiques stériques requises pour la fixation sur le récepteur d'une part et la production d'un stimulus conduisant à la réponse biologique finale d'autre part.

Malgré l'ampleur des moyens mis en oeuvre (plus de 300 analogues synthétiques des hormones neurohypophysaires ont été préparés, et leurs activités sur les principaux organes "cibles" mesurées), ces méthodes n'ont pas permis d'obtenir des informations précises sur la nature du récepteur, la conformation active de la molécule hormonale (36-37-9) et les caractéristiques cinétiques de l'intéraction hormone-récepteur.

Il est donc apparu que seule l'étude directe, en utilisant des hormones marquées, permettrait une approche correcte de l'étape d'intéraction hormone-récepteur. C'est l'approche expérimentale que nous avons suivie dans notre travail. Elle avait pour préalable la préparation d'une hormone neurohypophysaire marquée qui satisfasse aux exigences suivantes : 1° les molécules hormonales doivent avoir conservé l'ensemble de leurs propriétés physiologiques, 2° la pureté radiochimique

doit être aussi élevée que possible pour éliminer des artefacts éventuels dus à la présence de contaminants de haute radioactivité spécifique, 3° la radioactivité spécifique doit être suffisamment élevée (au moins 10 C /mMole) pour que l'on puisse espérer détecter quelques centaines de sites par cellule sur un échantillon de quelques milligrammes de tissu "cible". Le choix de l'indicateur doit se faire en fonction des exigences que l'on vient d'énoncer. Bien qu'un certain nombre d'hormones polypeptidiques monoiodées comme le glucagon (38), l'insuline (39) et l'ACTH (40) aient conservé leur activité biologique, il n'en est pas de même pour les hormones neurohypophysaires (41,42).

Dans le cadre d'une collaboration avec le groupe des molécules marquées du CEA Saclay (dirigé par P.Fromageot), nous avons préparé selon la méthode proposée par Agishi et Dingman (43) des hormones neurohypophysaires marquées au tritium. Cette méthode consiste à ioder la molécule hormonale, puis à effectuer une deshalogénation catalytique en présence de tritium gazeux. L'ocytocine et la lysine-vasopressine ainsi obtenues ont des radioactivités spécifiques variant de 10 à 35 Curies par millimole, et une activité biologique comparable à celle des hormones natives.

Dans une deuxième partie de notre travail, des sites de fixation de l'ocytocine [^{3}H] ont été recherchés sur les cellules épithéliales intactes et sur des "ghosts" de cellules épithéliales. Il n'existe aucun critère absolu permettant d'identifier ces sites de fixation aux sites récepteurs impliqués dans la réponse biologique. Une telle identification n'est possible que dans la mesure où une corrélation étroite peut être établie entre fixation et réponse biologique. L'établissement d'une corrélation entre la fixation d'hormone et l'activation de l'adényl-cyclase membranaire, représente comme nous l'avons souligné précédemment, l'approche la plus directe. Cependant, comme nous le discuterons au cours de ce travail, le système adényl-cyclasique activable in-vitro par les hormones neurohypophysaires a une affinité "apparente" pour l'hormone plus faible que celle du système in-vivo (26-27). C'est

pourquoi, dans cette première série d'études, l'intéraction a été recherchée sur un système intact constitué par les cellules épithéliales de l'épithélium isolé de la peau de grenouille. La mesure de la fixation d'ocytocine [^{3}H] en fonction de la concentration d'hormone marquée dans le milieu montre l'existence de deux catégories de sites récepteurs, différant par leur capacité de fixation et leur affinité pour l'ocytocine et ses analogues. Les sites à faible capacité de fixation (1000 sites environ par cellule) correspondent vraisemblablement aux sites impliqués dans l'initiation de la réponse biologique selon les critères suivants : a) affinité "apparente" de la fixation ($2,5 \times 10^{-9}$M) très voisine de celle que l'on peut déduire des courbes dose-effet natrifériques déterminées sur la même préparation ; b) fixation précédant le développement de la réponse biologique ; c) inhibitions de la fixation d'ocytocine [^{3}H] par l'arginine-vasotocine et la lysine-vasopressine dont l'intensité est identique à celle que l'on peut prévoir à partir des activités biologiques respectives de ces deux analogues ; d) inhibition parallèle de la fixation et de l'effet biologique par l'O-Méthyl tyrosine^2-carba-1 ocytocine, un inhibiteur compétitif de l'ocytocine sur la peau de grenouille. La deuxième catégorie de sites est caractérisée par une affinité plus faible pour l'ocytocine (affinité "apparente": 5×10^{-8}M) et une capacité de fixation plus élevée (10 000 sites environ par cellule). Le rôle physiologique éventuel de cette deuxième catégorie de sites reste à définir. Deux catégories de sites de liaison sont aussi présentes sur les "ghosts" des cellules épithéliales de la vessie des amphibiens. Seule la catégorie qui a une affinité élevée pour l'hormone est responsable de l'activation adényl-cyclasique.

Dans la dernière partie, nous avons étudié les caractéristiques cinétiques de l'intéraction entre la lysine-vasopressine-tritiée et ses récepteurs spécifiques de la membrane plasmique de rein de porc. La préparation membranaire que nous avons obtenue ne contient pas d'enzyme de dégradation de l'hormone, aussi avons-nous déterminé avec précision les caractéristiques cinétiques de la formation et de la dissociation du complexe hormone-récepteur. La comparaison précise

des cinétiques d'activation de l'adényl-cyclase et de fixation de la vasopressine $\left[^{3}H\right]$, nous a permis de montrer que la stimulation de l'adényl-cyclase est à tout moment fonction de la concentration du complexe hormone-récepteur. Ce résultat exclut, dans le système que nous étudions, la validité de la théorie proposée par Paton (44) postulant que l'intensité du stimulus résultant de l'intéraction hormone- récepteur est fonction du taux de renouvellement de l'hormone sur les sites récepteurs.

Enfin, les relations quantitatives existant entre l'occupation des récepteurs et l'activation de l'adényl cyclase ont été précisées.

CHAPITRE PREMIER

M E T H O D O L O G I E

Nous limiterons volontairement ce chapitre à l'exposé des méthodes indispensables à l'étude de l'intéraction hormone-récepteur :

1°) la description des techniques de mesure des effets biologiques que nous avons utilisés comme index de l'efficacité de l'intéraction hormone-récepteur (HR) (augmentation du transport actif de Na^+ sur l'épithélium isolé, activation de l'adényl cyclase sur les fractions particulaires)

2°) la préparation des hormones marquées et la description des techniques utilisées pour déterminer la concentration du complexe (HR).

A) MESURE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES

1) Sur l'épithélium isolé de la peau de grenouille

La peau de grenouille est formée d'un épithélium pluristratifié fonctionnellement orienté et supporté par une couche de tissus conjonctifs (figure 1). Seules les cellules épithéliales, qui représentent moins de 20% de l'ensemble de la structure, sont le siège d'un transport actif de Na^+ stimulé par les hormones neurohypophysaires (45).

- Préparation de l'épithélium isolé

Comme l'a suggéré Ussing (46) et comme l'ont décrit Rawlins et al (47), il est possible de séparer l'épithélium du derme en appliquant une pression hydrostatique sur la face interne de la peau (pression de 140 cm d'eau). Toutefois, l'épithélium isolé par cette technique a une résistance électrique plus faible que celle de la peau entière (47).

Nous avons utilisé la méthode proposée par Erlij et Aceves (48),

Figure I : MICROPHOTOGRAPHIES DE LA PEAU ET DE L'ASSISE EPITHELIALE ISOLEE

Dans la peau intacte (partie supérieure de la figure), l'assise épithéliale ne représente qu'une faible fraction de l'épaisseur de la structure.

Dans l'assise épithéliale isolée (partie inférieure de la figure) on peut reconnaître:

- le stratum cornéum, fortement kératinisé
- le stratum spinosum et le stratum granulosum, formés de 5 à 6 assises de cellules
- le stratum germinativum

Quelques glandes à mucus sont entraînées avec l'assise épithéliale. Des fragments sont visibles au-dessous de l'épithélium (partie inférieure de la figure). D'après un cliché de N. CARASSO et P. FAVARD.

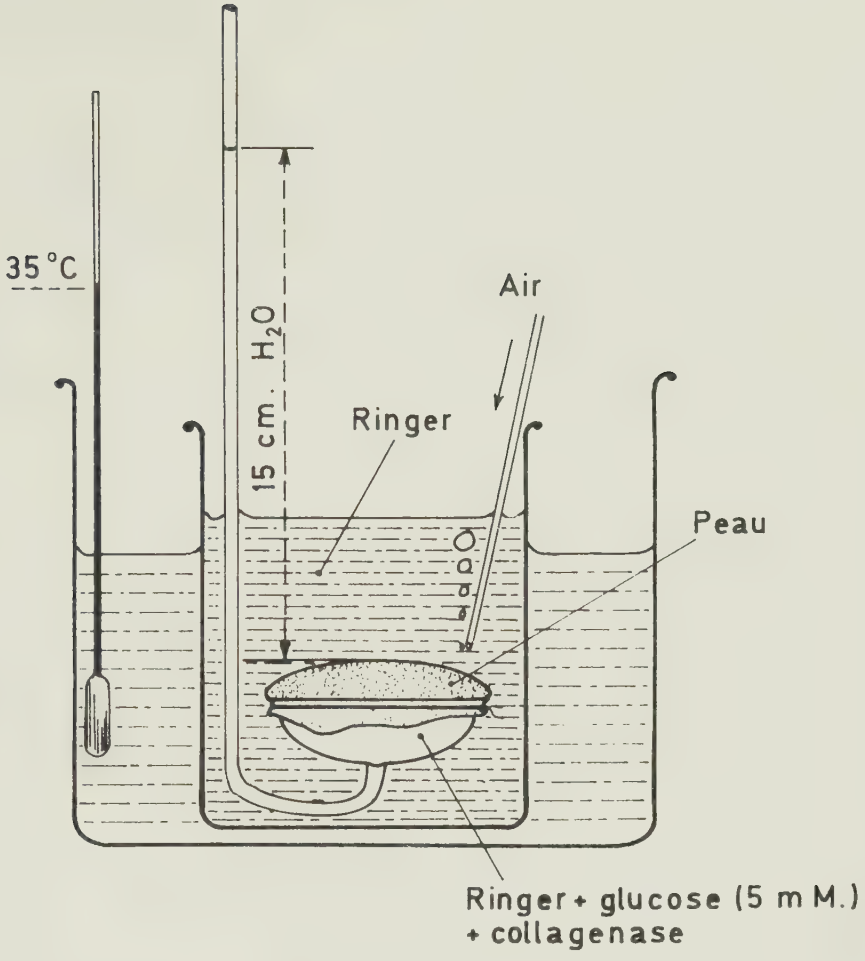


Figure 2 : SCHEMA DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISE POUR LA SEPARATION DE L'EPITHELIUM

La peau est tendue sur une pipe de verre. Par sa face interne elle est au contact d'une solution de Ringer glucosé contenant de la collagenase (43,5 unités/ml). Le tambour de verre est immergé dans une solution de Ringer. Une pression hydrostatique de 15 cm d'eau est appliquée sur la face interne de la peau. L'ensemble est incubé à la température de 35°C pendant 90 minutes.

Aceves et Erlij (49) puis par Rajerison et al (45). Elle consiste à effectuer un traitement à la collagénase* et à appliquer simultanément une pression hydrostatique. Les détails du dispositif expérimental utilisé pour isoler l'épithélium sont représentés dans la figure 2. Des grenouilles (Rana esculenta) de 30 à 70 g sont conservées dans de l'eau courante, et sont adaptées à la température du laboratoire, 48 heures au moins avant le début des expériences. La peau ventrale, d'une surface d'environ $40cm^2$ est prélevée sur l'animal après section du bulbe et destruction de la moelle épinière. La peau est fixée sur l'extrémité élargie d'une pipe de verre de 5cm de diamètre. Le derme est situé vers l'intérieur de la pipe qui est remplie avec une solution de Ringer (Na^+ 112mM, K^+ 3,2mM, Ca^{++} 1mM, Mg^{++} 1mM, Cl^- 114mM, HCO_3^- 2mM, SO_4^{--} 1mM et HPO_4^{--} 1,2mM) contenant 5 mM de glucose et 40 U/ml de collagenase* type I. L'ensemble est immergé dans une solution de Ringer sans collagénase, maintenue à 35°c et oxygénée par barbotage d'air. Une pression hydrostatique de 15cm est appliquée en permanence sur la face interne de la peau pendant la durée de l'incubation, soit 90 minutes. L'effet combiné de la pression hydrostatique et de la collagénase assure une séparation partielle entre l'épithélium et le derme. A la fin de l'incubation, la peau est détachée de la pipe. La séparation complète de l'épithélium et du derme est assurée en grattant légèrement la surface externe du derme avec une lame de microscope rodée. Dans la majorité des préparations $15cm^2$ d'épithélium peuvent être obtenus.

- Mesure du transport actif de Na^+

La figure n° 1 montre l'aspect histologique de la peau intacte et de l'épithélium isolé fixés par la glutaraldéhyde à 2% dans un tampon cacodylate 0,11M pH 7,4. L'assise épithéliale comprenant le stratum germinativum est complètement séparée du derme et des chromatophores. Quelques glandes à mucus sont entraînées. En comptant le nombre de noyaux par unité de longueur sur des sections perpendiculaires à la

---

* La liste des produits utilisés dans ce travail, leur provenance ainsi que leur abréviation éventuelle est donnée dans le tableau 1.

TABLEAU N°1 LISTE DES PRODUITS UTILISES, ORIGINE ET ABREVIATION EVENTUELLE

NOM	ORIGINE	ABREVIATION
Ocytocine	Fournies généreusement par le Dr Boissonnas (SANDOZ)	Ocy.
Arginine-8-ocytocine		Arg.8 -Ocy.
Lysine-vasopressine		L.V.P.
O-méthyl-tyrosine2 carba-1-ocytocine	Fournies généreusement par les Drs Jost et Barth (Académie des Sciences de Tchécoslovaquie)	(O-méthyl)-tyr.2carba-1-Ocy.
O-méthyl-tyrosine2-ocytocine		(O-méthyl)-tyr.2 Ocy.
Collagénase de Clostridium Type I	Sigma Chemical Company	
Venin de Serpent (Crotalux-atrox)		
Créatine-kinase	Boehringer	
Phosphocréatine (sel de Na^+)		
Puromycine (lot 3027)	Nutritional Biochemicals Corporation	
Cycloheximide (Actidine)	Upjohn Company	
Dithiothréitol	Calbiochem	D.T.T.
Soluène	Packard Instrument Company	
Adénosine triphosphate (sel de Na^+)	P.L.Biochemical Inc.	ATP
Adénosine cyclique monophosphate	Sigma Chemical Company	AMPc
AMP cyclique $[^3H]$	Commissariat à l'Energie Atomique (SACLAY)	AMPc $[^3H]$
Adénosine triphosphate-α-$[^{32}P]$		ATP $[\alpha\text{-}^{32}P]$
Tyrosine $[^{14}C]$	New England Nuclear Corporation	Tyr. $[^{14}C]$

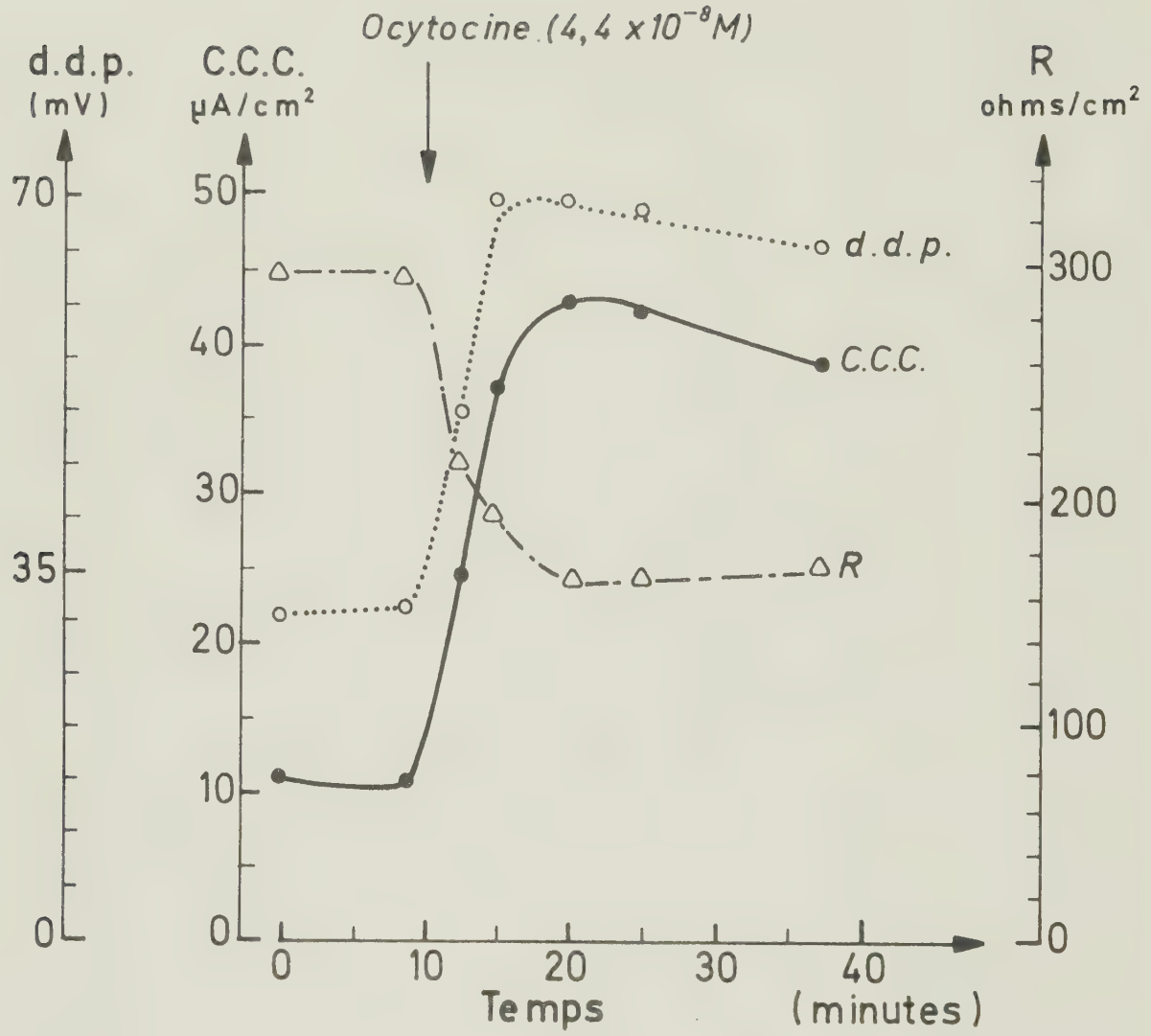


Figure 3 : EVOLUTIONS DU COURANT DE COURT-CIRCUIT (C.C.C.), DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL (d.d.p.) TRANSMEMBRANAIRE ET DE LA RESISTANCE AU COURS D'UNE STIMULATION PAR L'OCYTOCINE

Le courant de court circuit est mesuré selon la technique de Ussing et Zerahn (51). La différence de potentiel transépithéliale est mesurée en interrompant pendant quelques secondes le passage du courant dans le circuit externe. La résistance est calculée en faisant le rapport entre la d.d.p. et le C.C.C.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'intensité du courant de court circuit mesure le flux net de transport actif de sodium à travers l'épithélium. Lorsqu'on stimule l'épithélium par l'ocytocine, malgré une baisse importante de la résistance, l'évolution de la différence de potentiel est voisine de celle du courant de court-circuit. La différence de potentiel peut être considérée comme une mesure satisfaisante de l'effet natriférique de l'ocytocine. D'aprés RAJERISON (52)

surface, on peut calculer qu'un épithélium contient $2,3 \times 10^6$ "cellules actives" par mg de poids frais. Les "cellules actives" sont celles du stratum germinativum et du stratum granulosum, les autres cellules n'ayant plus de noyau et d'organites fonctionnels. Une étude détaillée au microscope électronique de l'épithélium préparé selon cette technique a été faite par Carasso et al (50). Elle montre que la séparation se produit entre la membrane basale et les cellules épithéliales du stratum germinativum, et que les organites cellulaires ne présentent aucun signe d'altération. Rajerison et al (45) ont clairement établi que l'épithélium isolé par cette technique conserve l'ensemble des caractéristiques de transport et de perméabilité de la peau intacte. Le transport actif de Na^+ et la perméabilité osmotique à l'eau de l'épithélium demeurent inchangés lors de sa séparation du derme. De plus, les hormones neurohypophysaires, l'AMP cyclique, la théophylline sont capables de stimuler le transport actif de Na^+ et la perméabilité à l'eau aussi bien sur l'épithélium isolé que sur la peau intacte (45). Le transport actif de Na^+ peut être mesuré par la méthode du courant de court circuit proposée par Ussing et Zerahn (51). La figure n° 3 montre que la mesure de la différence de potentiel transépithéliale (d.d.p.) peut être un critère valable de la mesure de ce transport. On peut notamment remarquer que l'augmentation du transport actif de Na^+ qui suit l'addition d'ocytocine peut être appréciée convenablement par l'évolution de la d.d.p., ceci malgré la chute de résistance qui se produit lors de la stimulation hormonale qui est comparable à celle observée sur la peau intacte (45). Nous avons utilisé la d.d.p. comme critère de mesure du transport actif de Na^+. Pour chacune de nos expériences, quatre à six fragments circulaires d'épithélium isolé sont découpés à l'emporte-pièce dans cette surface épithéliale. La face muqueuse de chaque fragment est étalée sur une toile de nylon, l'ensemble est monté horizontalement entre deux chambres de plexiglass. Les deux chambres sont remplies de Ringer que l'on oxygène par barbotage d'air. Ce Ringer est tamponné par 2,5mM de TRIS-Hcl pH8, et contient 5mM de glucose. La différence de potentiel

est mesurée en permanence par l'intermédiaire d'électrodes au calomel reliées à un millivoltmètre et introduites dans les chambres interne et externe. L'observation d'une variabilité importante de la sensibilité à l'ocytocine d'un épithélium à l'autre, nous a conduits à n'utiliser pour chaque expérience que des fragments provenant du même épithélium. Nous avons également sélectionné pour chaque expérience les fragments d'épithélium présentant les mêmes différences de potentiel au repos et des réponses identiques à l'ocytocine. (un test de sensibilité est fait avant chaque expérience).

2) Sur les structures membranaires isolées

L'activité biologique que nous avons mesurée sur les systèmes acellulaires est la stimulation de l'adényl cyclase membranaire par les hormones neurohypophysaires.

- Préparation des "ghosts" de cellules épithéliales de la vessie de grenouille

La méthode utilisée est celle de Hays et Coll (53) adaptée à nos conditions expérimentales. Elle consiste à complexer le Ca^{++} par 5mM d'EDTA. L'absence de Ca^{++} entraîne le détachement des cellules les unes des autres et de la membrane basale qui les supporte, et permet la libération des protéines solubles.

Les vessies de grenouille sont montées en sac, remplies d'une solution de Ringer dont la concentration en Na^{+} n'est que de 5,7mM. Elles sont plongées dans une solution de Ringer normale (voir composition plus haut) oxygénée. Après une heure d'équilibration, les vessies sont remplies d'une solution de Ringer sans Ca^{++} contenant 5mM d'EDTA, et incubées pendant 30 minutes à 0°c dans la même solution. Les cellules épithéliales sont détachées en pressant doucement les vessies puis récupérées avec la solution remplissant la vessie. Elles sont ensuite centrifugées à 1200 g pendant 5 minutes à 0°c. Le culot est resuspendu dans une solution hypotonique contenant 5mM d'EDTA. Cette solution est

tamponnée avec 25mM de TRIS HCl pH8 (1ml pour 5 vessies). Les cellules sont alors homogénéisées dans un potter Elvehjem en verre (5 à 6 passages). Cet homogénat (décrit dans nos expériences sous le nom d'Enzyme I) est soit utilisé immédiatement, soit congelé rapidement et conservé dans l'azote liquide. Ce procédé de conservation assure une bonne préservation des différentes activités enzymatiques étudiées.

Pour l'étude du rôle du Ca^{++} dans l'activation de l'adényl cyclase, une extraction complémentaire du Ca^{++} présent a été réalisée de la manière suivante : l'enzyme I (préparé à partir de 10 vessies) est dilué dans 100 ml de TRIS-HCL pH8, 25mM contenant 5mM d'EDTA et centrifugé pendant 5 minutes à 4500 g à 0°. Le culot est dispersé dans 20ml de TRIS-HCL pH8, 25mM contenant 20mM d'EGTA et incubé pendant 10 minutes à 20°c. La solution est recentrifugée pendant 5 minutes à 4500 g à 0°c. Le culot est lavé dans 100 ml de TRIS-HCl, pH8, 25mM et dispersé dans 1,5ml du même tampon. (Cet enzyme est appellé enzyme II dans nos expériences).

- Préparation des membranes plasmiques de médulla de rein de porc.

Les reins de porc prélevés stérilement sont fournis par la Socité Sorga de la Villette et maintenus à 4°c. La médulla interne (40g pour deux reins) est rapidement disséquée à 0°c et immédiatement homogénéisée. Nous avons préparé des membranes plasmiques "purifiées" en utilisant la technique décrite par Emmelot et al (54). La médulla interne est homogénéisée avec un potter Elvehjem de verre dans une solution de bicarbonate (1mM) à 4°c. L'homogénat est filtré sur laine de verre, il est complété à 800 ml et centrifugé à 1200g. Le culot est redispersé dans la solution de bicarbonate (1mM) avec un potter à piston de téflon. Ce nouvel homogénat est dilué dans 800 ml d'une solution de bicarbonate (1mM) et centrifugé à 1200 g. Le lavage du culot 1200 g est repris 5 à 6 fois. Les membranes plasmiques sont séparées des autres organites par flottaison dans un gradient discontinu (les zones de ce gradient sont composées de sucrose de densités égales à 1,16 ; 1,18 ; 1,20 ; et 1,30, les membranes sont mélangées dans le sucrose de densité 1,30)

La centrifugation des gradients est faite pendant 1 heure à 60 000 g. Les membranes sont collectées après centrifugation à l'interface des zones de densités 1,16 et 1,18. La majorité des expériences décrites dans ce travail ont été réalisées en utilisant une technique simplifiée de préparation des membranes. La médulla (40g) est homogénéisée à 4°c dans un milieu isotonique contenant 250mM de sucrose, 5mM de TRIS-HCl pH8, 3mM de Mg Cl2 et 1mM d'EDTA pH8. Après filtration sur laine de verre, l'homogénat est centrifugé à 300 g. Le culot est resuspendu dans le milieu d'homogénéisation rendu hypotonique par suppression du sucrose et maintenu 10 minutes sous agitation à 20°c. Ce milieu hypotonique assure la lyse des globules rouges présents en grande quantité dans l'homogénat de médulla. Le lysat est centrifugé à 300 g à une température de 4°c. Le culot est ensuite lavé 5 à 6 fois dans ce même milieu. Les membranes obtenues par cette préparation sont appelées "membranes partiellement purifiées". Ces deux types de membranes peuvent être conservées congelées dans l'azote liquide pendant plusieurs mois sans dénaturation de leurs activités enzymatiques.

- Mesure des activités enzymatiques adényl-cyclasiques

Technique de mesure

La réaction adényl-cyclasique s'effectue dans un volume de 100µl à 30°c pendant des temps variables, selon les conditions expérimentales. Dans les conditions habituelles, le milieu d'incubation contient 100mM de TRIS-HCl pH8 ; 10mM de MgCl2 ; 0,25mM d'ATP ; 0,65 µCi d'ATP - $[\alpha\ P^{32}]$, 1mM d'AMP cyclique, et éventuellement des hormones neurohypophysaires ou du fluorure. Un système régénérateur d'ATP est introduit afin de maintenir constante la concentration d'ATP. Il est composé de 20mM de phosphocréatine et de 100µg de créatine-kinase, et permet de former de l'ATP à partir d'ADP. L'ADP provient, dans nos conditions expérimentales, des activités ATPasiques Na^+-K^+ et Mg^{++} dépendantes. Le système régénérateur d'ATP n'a pas d'influence sur l'affinité "apparente" du système adényl-cyclasique pour l'hormone (voir figure 15). L'AMP cyclique non marqué introduit, permet une dilution de radioactivité

spécifique de l'AMP cyclique -$[\alpha\ P^{32}]$ formé par l'adényl cyclase à partir de l'ATP-$[\alpha\ P^{32}]$ - 1mM d'AMP cyclique permet d'inhiber complètement la destruction de l'AMPc-$[\alpha\ P^{32}]$ formé par les phosphodiestérases présentes dans une préparation de "ghosts" de cellules épithéliales de la vessie de crapaud (27). Une légère inhibition de l'activité adénylcyclasique a été observée dans ce système en présence de 1mM d'AMP cyclique, cette inhibition (15%) est cependant moins importante que celle observée (40%) en présence de théophylline à une concentration suffisante pour inhiber totalement les phosphodiestérases (27). La réaction adénylcyclasique est déclenchée par l'addition des fractions particulaires. Elle est arrêtée par l'addition de 150μl d'une solution (solution d'arrêt) contenant 50mM de TRIS-HCl pH 7,6 ; 5mM d'AMP cyclique ; 3,3mM d'ATP ; et $5 \times 10^{-3}\mu$Ci d'AMP cyclique $[^3H]$ et maintenue à 0°c. La concentration élevée d'ATP du milieu d'arrêt introduit une importante dilution de l'ATP-$[\alpha\ P^{32}]$ (dilution de radioactivité spécifique de 13 fois). L'échantillon est immédiatement filtré sur colonne d'oxyde d'alumine selon la méthode proposée par Ramachandran et Al. (55). La totalité du milieu (soit 250μl après avoir arrêté la réaction) est déposée sur une colonne d'oxyde d'alumine neutre sec (hauteur 5 cm, diamètre 0,5 cm correspondant à 1 g d'oxyde d'alumine). L'AMP cyclique est éluée de la colonne par 1,5ml de TRIS-HCl (50mM-pH 7,6). La totalité de l'éluat (1ml) est recueillie directement dans une fiole de comptage. Les autres nucléotides et en particulier l'ATP, l'ADP, et l'AMP non cyclique ne sont pas élués (55). L'AMP cyclique $[H^3]$ introduit avec le milieu d'arrêt permet de calculer le rendement de récupération de l'AMP cyclique. Les comptages sont faits dans un mélange scintillant de Bray (56) dans des conditions appropriées de discrimination entre le tritium et le P^{32}. Les concentrations de protéines sont déterminées par la méthode de Lowry (57) en utilisant la sérum-albumine bovine cristallisée comme standard. La quantité d'AMP cyclique-$[\alpha\ P^{32}]$ formée est calculée à partir du rapport radioactivité éluée/radioactivité spécifique de l'ATP$[\alpha\ P^{32}]$ introduit dans le milieu de réaction. Cette quantité est corrigée 1°) pour le rendement de récupération 2°) pour la valeur

d'un blanc correspondant à un échantillon dilué par le milieu d'arrêt immédiatement après avoir ajouté l'enzyme. La valeur de ce blanc ne dépasse pas 10% de la plus petite activité adényl-cyclasique mesurée. L'alumine retient 99,997% de l'ATP.

C o n t r ô l e de la v a l i d i t é de la m é t h o d e

Nous avons vérifié que la radioactivité ^{32}P éluée de la colonne est sous forme d'AMP cyclique.

- Le rapport ^{32}P / ^{3}H dans l'éluat de la colonne d'alumine n'est pas modifié après traitement au sulfate de zinc (5%) et $Ba(OH)_2$ (à saturation) à pH7,2, qui selon Krishna assure la précipitation de tous les nucléotides adényliques non cycliques à l'exception de l'adénosine (qui n'est pas marquée dans notre système). La valeur du rapport P^{32} / H^{3} obtenu pour l'éluat des colonnes d'alumine divisé par la valeur de ce même rapport obtenu sur le surnageant de précipitation est de 1,12$\pm$ 0,1 pour 12 déterminations.

- 97% de la radioactivité P^{32} migrent avec l'AMP cyclique non marqué lorsque l'éluat des colonnes d'alumine est chromatographié dans le système binaire éthanol-acétate d'ammonium (3/7, V/V) sur plaque mince de cellulose.

- Les radioactivités ^{3}H et ^{32}P se comportent de façon identique lors de l'action de la phosphodiestérase sur l'éluat des colonnes d'alumine. 40 µl d'un éluat de colonne d'alumine sont incubés à 25°c pendant 1 heure avec 100 µl d'une solution contenant du Tris-HCl pH8 25mM ; 3mM de MgCl2 ; et 7,5mM de KCl. La réaction est commencée en ajoutant 100 µg de phosphodiestérase de coeur de boeuf. Ceci permet de transformer l'AMP cyclique en 5'AMP. Après 1 heure, et sans arrêter la réaction, on ajoute 60 µg de phosphatase de venin de serpent (crotalus atrox) et 0,3mM de 5'AMP. La réaction est poursuivie pendant 10 minutes. La phosphatase permet de transformer le 5'AMP en adénosine.La réaction est enfin arrêtée par une ébulliton de 3 minutes. La totalité du milieu d'incubation est chromatographiée dans les mêmes conditions que précédemment. 96,4% de la radioactivité ^{32}P et 98% de la radioactivité ^{3}H ont

disparu de la tâche d'AMP cyclique. La transformation du 5'AMP en adénosine est nécessaire car le 5'AMP migre avec un Rf qui est peu différent de celui de l'AMP cyclique, dans le système de chromatographie choisi.

B) PREPARATION D'OCYTOCINE ET DE VASOPRESSINE TRITIEES. MESURE DE LA LIAISON ENTRE CES HORMONES MARQUEES ET LEURS SITES DE FIXATION CELLULAIRES

1) Préparation des hormones neurohypophysaires tritiées

- Introduction

Au cours des dix dernières années, trois types de marquage isotopique des molécules hormonales polypeptidiques ont été réalisés :

- le marquage à l'iode I^{131} ou I^{125} des radicaux tyrosyl ou histidine des protéines. Il permet d'obtenir de très hautes radioactivités spécifiques (17200 C /m Atome pour l'I^{131}), aussi a-t-il été largement utilisé. Il présente cependant de graves inconvénients. L'encombrement stérique d'un atome d'iode est voisin de celui du radical tyrosyl. De plus, son électronégativité induit des modifications importantes des caractéristiques des atomes voisins. Pour des hormones de poids moléculaire relativement élevé comme le glucagon, l'insuline, l'ACTH, l'introduction d'un seul atome d'iode par molécule est compatible avec le maintien d'une activité biologique égale à celle des hormones naturelles (39-40-41). Récemment Thompson et al (41) ont iodé l'ocytocine puis séparé la monoiodo ocytocine des molécules di-iodées et natives. La monoiodo ocytocine a conservé 10 à 40% de l'activité biologique initiale mesurée sur le système adényl-cyclasique de la vessie de crapaud, et 75 à 80% de son activité mesurée par sa capacité à stimuler l'oxydation du glucose des cellules adipeuses. La lysine et l'arginine vasopressine iodéesn'ont plus que 1% de l'activité antidiurétique de l'hormone native (mesurée sur le rat). Nous avons montré que l'iodation progressive de l'ocytocine par le monochlorure d'iode diminue progressivement son

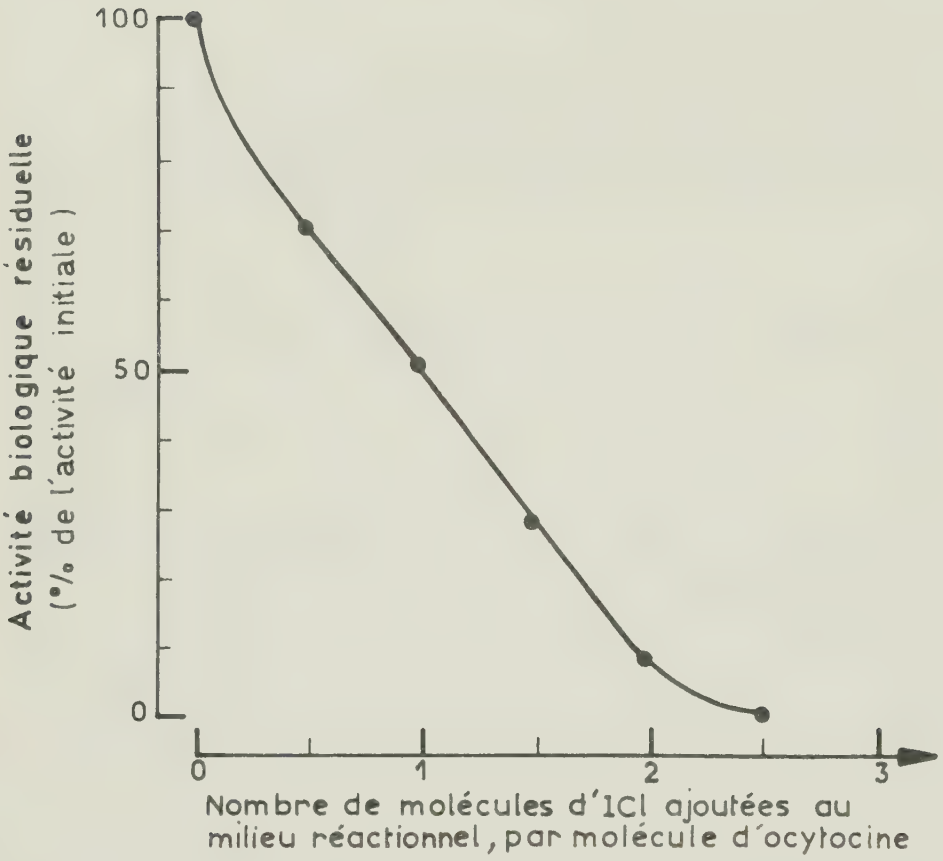


Figure 4 : IODATION DE L'OCYTOCINE. CORRELATION ENTRE LE DEGRE D'IODATION ET L'ACTIVITE BIOLOGIQUE RESIDUELLE

1 µmole d'ocytocine est diluée dans 200 µl de tampon phosphate (10^{-3}M ; pH 6,4). Le monochlorure d'iode dissout dans 25 µl de méthanol est ajouté au milieu d'incubation au temps 0. Le nombre de molécules d'ICl ajoutées par molécule d'ocytocine varie de 0,5 à 2,5. La réaction dure 20 minutes à 4°C. L'activité biologique "Avian depressor" est alors immédiatement mesurée selon la méthode de Coon (59).

activité biologique "avian depressor" mesurée selon la méthode de Coon (59) (fig.4) Lorsque 2,5 molécules d'ICl agissent avec une molécule d'ocytocine, l'activité biologique du produit formé est nulle.

- plusieurs méthodes de marquage interne par le ^{14}C et le ^{3}H ont été décrites. Elles sont susceptibles de respecter les propriétés de l'hormone native puisque ces deux atomes ont des propriétés physicochimiques très peu différentes des atomes non radioactifs correspondants. Walter et Coll (60), Havran et Coll (61) ont incorporé au cours de la synthèse totale en milieu solide de la glycinamide ^{14}C en position 9 de l'ocytocine, de l'arginine ou de la lysine-vasopressine. Les hormones obtenues conservent leurs propriétés biologiques, mais les radioactivités spécifiques atteintes (0,03 C/mMole) sont trop faibles pour l'étude que nous nous proposions de faire.

Trois méthodes de tritiation des hormones neurohypophysaires ont été décrites :

1/ La tritiation selon la méthode de Wilzbach (62). Elle consiste en une substitution sur des positions non spécifiques, de l'hydrogène par le tritium gazeux. Schwartz et coll (63) et du Vigneaud et coll (64) ont obtenu par cette méthode des hormones faiblement radioactives (de 0,1 à 15 mC /mMole).

2/ La tritiation par incorporation d'acides aminés marqués dans le peptide au cours de la synthèse totale. Elle fut réalisée par Du Vigneaud et coll (54), puis récemment par Sjöholm et Carlson (65). Les radioactivités spécifiques obtenues sont élevées (2 à 3 C/mMole), mais la méthode très coûteuse.

3/ La tritiation proposée par Agishi et Dingman (43), consiste elle, en une déshalogénation catalytique de l'ocytocine iodée par le tritium gazeux. On peut obtenir théoriquement une activité spécifique égale à 60C/mMole

pour 2 atomes de tritium incorporés.

Nous avons choisi d'utiliser cette méthode pour la tritiation de l'ocytocine et de la lysine-vasopressine.

- Préparation et caractéristiques de l'ocytocine tritiée.

La tritiation de l'ocytocine a été réalisée en collaboration avec J.L.Morgat, L.T. Hung, R.Cardinaud et P.Pradelles (66) du groupe des molécules marquées du CEA Saclay dirigé par P.Fromageot.

I o d a t i o n d e l' o c y t o c i n e.

10 µ moles d'ocytocine sont diluées dans 2,2 ml d'une solution de tampon phosphate (10^{-3}M, pH6,4). 25 µ moles d'ICl dissout dans 0,25 ml de méthanol sont ajoutées très doucement à la solution d'ocytocine en même temps qu'un traceur d'iode ^{131}I Cl. La réaction dure 20 minutes à 4°c, l'excès d'ICl et l'iode formé par hydrolyse sont réduits par la thiosulfate de Na^+ 0,1 M à la fin de la réaction. Le maximum d'absorption du spectre U.V. de l'ocytocine passe de 275mµ à 312mµ au cours de cette iodation. Ce déplacement du spectre U.V. est caractéristique de la formation de di-iodo tyrosine au sein de la molécule (66,67). Le degré de iodation est vérifié par une électrophorèse sur papier d'une petite fraction du mélange réactionnel. Le solvant d'électrophorèse est un tampon pyridine-acétate 7×10^{-2}M, pH 6,5. Le champ électrique E= 12 volts/cm est appliqué pendant 1 heure. Le peptide iodé migre vers la cathode, alors que les iodures migrent vers l'anode. Connaissant d'une part la radioactivité spécifique de l'ICl au début de la réaction et d'autre part, les radioactivités ^{131}I retrouvées sur le peptide et sous forme d'iodure, on peut calculer le degré de iodation du peptide. Il est généralement de deux atomes d'iode fixés par molécule d'ocytocine. Nous avons également observé pour plusieurs préparations que l'activité biologique de l'hormone iodée est nulle (fig.4). L'iodo-ocytocine est séparée des ions organiques par filtration sur colonne échangeuse d'ions $AG_{11}A_8$ (50-100 mesh) qui retient à la fois les anions et les cations.

Tritiation de l'iodo-ocytocine

L'iodo-ocytocine concentrée à 1 ml est placée dans un réacteur à tritiation (68) (69). La déshalogénation catalytique a lieu en présence de 10 mg de Palladium sur alumine et de 10 Curies de tritium gazeux à 99,8% de pureté. La réaction dure 20 minutes. Le tritium gazeux en excès est ensuite transféré sur un four à uranium pyrophorique. Au cours de la phase de tritiation des échanges s'opèrent entre le tritium et l'hydrogène de l'eau et entre les hydrogènes des groupes NH, SH et OH de la molécule d'hormone et ceux de l'eau. Après avoir séparé le catalyseur par filtration sur filtre millipore (Mitex), le tritium présent sous ces différentes formes (tritium labile) est éliminé par une succession de dilutions et de concentrations dans un évaporateur rotatif et ceci jusqu'à l'obtention d'une radioactivité distillable négligeable.

Purification de l'ocytocine tritiée sur colonne de Bio-Gel P_2

L'ocytocine tritiée est filtrée sur une colonne de Bio-gel P_2 (de 40 cm de hauteur et 2 cm de diamètre) équilibrée avec un tampon acétate (10^{-3}M, pH 4,6). L'éluat est collecté par fractions successives de 2 ml. Pour chacune d'entre elles, on mesure 1) la densité optique à 275 mμ 2) le contenu en radioactivité ^{3}H et I^{131} 3) l'activité biologique "avian-depressor" (59). Deux pics de densité optique sont généralement obtenus. Le premier contient du tritium mais pas d'iode ; le rapport activité biologique/radioactivité ^{3}H est constant dans chacune des fractions (donc le produit marqué a la même radioactivité spécifique quelque soit la fraction d'élution). Ce pic correspond à de l'ocytocine tritiée. Le second ne nous intéresse pas, il correspond à de l'ocytocine partiellement deshalogénée (qui contient encore de l'iode). La quantité d'ocytocine tritiée obtenue varie de 0,05 μM à 0,1 μM. Elle est déterminée par la méthode de Lowry et al (57) en utilisant l'ocytocine de synthèse comme référence.

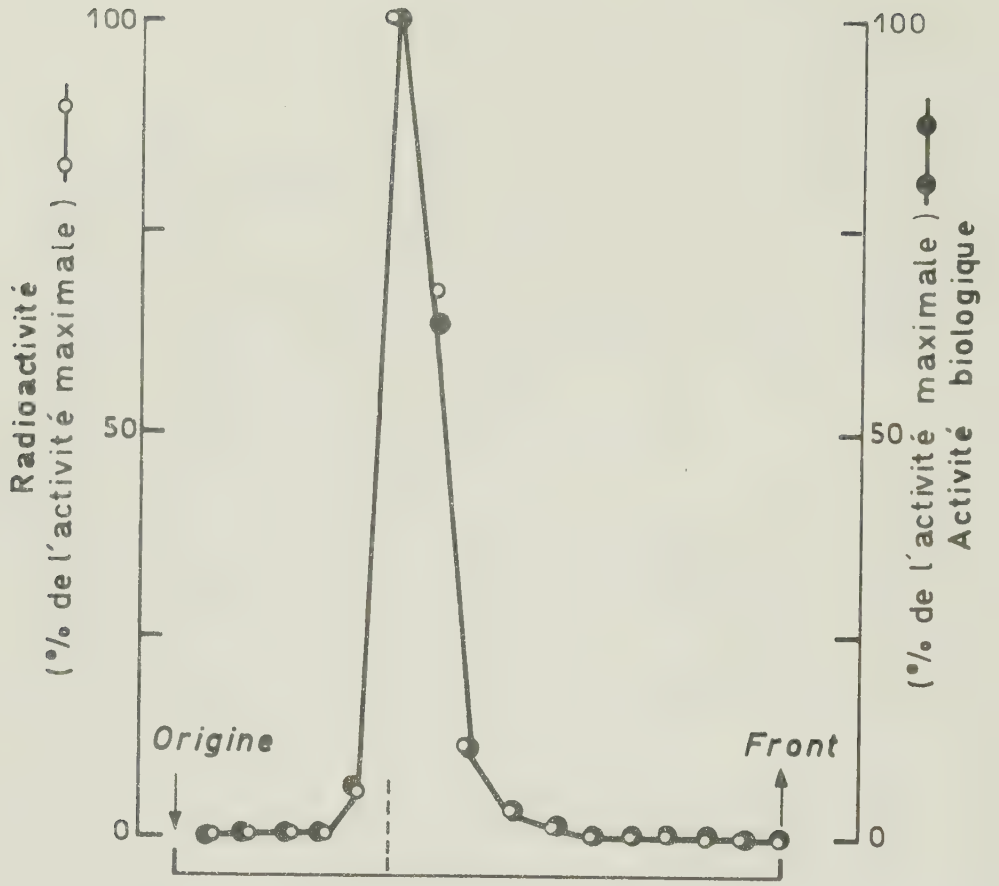


Figure 5 : RADIOCHROMATOGRAMME DE L'OCYTOCINE $[^3H]$

20 nmoles d'ocytocine non marquée, qui serviront d'entraîneur, sont mélangées avec une dose traceuse d'ocytocine $[^3H]$ (2,5 X 10^{-5}dpm soit 0,05 nmole) et déposées sur une plaque mince de cellulose. La chromatographie ascendante est développée pendant 15 h à 4°C dans un système ternaire butanol-acide acétique-eau (4/1/5/ v/v). La plaque de cellulose est divisée en bandes de 1 cm. La poudre de chaque bande est collectée et suspendue pendant 15 h à 4°C dans 1 ml d'acide acétique à 0,5%. Après centrifugation de la poudre, la radioactivité (o) et l'activité biologique (●) "Avian-depressor" sont mesurées dans les échantillons successifs.

Pureté radiochimique et activité biologique de l'ocytocine tritiée :

Quelques caractéristiques de l'ocytocine native, iodée ou tritiée sont données dans le tableau 2. L'activité biologique est mesurée par quatre tests différents et un utilisant l'ocytocine de synthèse comme produit de référence. L'activité "avian depressor" est mesurée selon la méthode de Coon (59). L'activité natriférique est mesurée par l'augmentation du courant de court-circuit, selon la méthode de Ussing et Zerahn (51). L'activité utérotonique est mesurée selon la méthode décrite par Stürmer (70). Enfin, l'activité adényl-cyclasique est mesurée en utilisant la méthode décrite page 16. Sur ces quatre tests biologiques, l'activité biologique de l'ocytocine [^{3}H] est la même que celle de l'ocytocine native.

La pureté radiochimique a été déterminée par chromatographie sur plaque mince de cellulose (figure 5). Aucune impureté radiochimique n'est décelable. Le comportement chromatographique de l'ocytocine tritiée et des molécules non marquées est strictement identique. La radioactivité spécifique varie de 10 à 35 C/mMole selon les préparations. Deux préparations d'ocytocine tritiée ont été utilisées dans le travail présenté, leurs radioactivités spécifiques étaient respectivement de 15 et 24 C/mMole.

- Préparation et caractéristiques de la vasopressine tritiée.

La tritiation de la lysine vasopressine a été réalisée par Pradelles, J.L.Morgat et P.Fromageot (71), selon la technique précédemment décrite pour la tritiation de l'ocytocine. La purification est réalisée par chromatographie d'affinité par M.Camier, D.Bonne et P.Cohen (71). Cette méthode consiste à retenir spécifiquement la lysine-vasopressine tritiée sur de la neurophysine couplée par liaison covalente à un gel d'agarose. Le gel d'agarose-neurophysine est introduit dans une colonne sur laquelle la solution contenant la lysine-vasopressine tritiée est filtrée ; la monoiodolysine vasopressine ainsi que la lysine-vasopressine monoiodé-monotritiée sont éluées sans être retenues par la neurophysine.

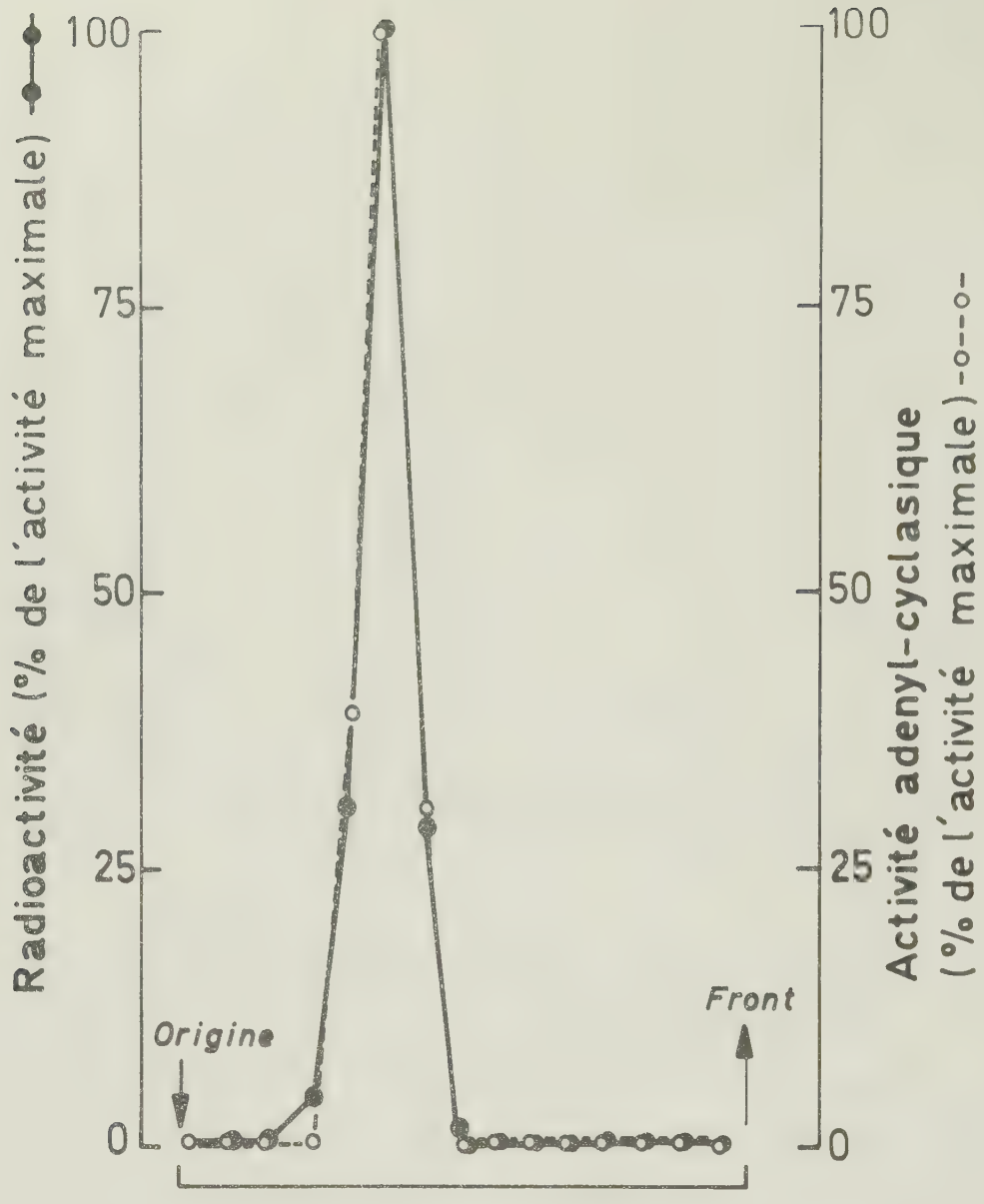


Figure 6 : RADIOCHROMATOGRAPHIE DE LA LYSINE-VASOPRESSINE $[^3H]$

20 nmoles de lysine-vasopressine non marquée sont mélangées avec une dose traceuse de lysine vasopressine $[^3H]$ (2 X 10^5dpm soit 0,01 nmole) et déposées sur une plaque de gel de silice. La chromatographie ascendante est développée pendant 8 h à 4°C dans le système n-butanol-pyridine-acide acétique-eau (15/10/3/6 v/v). La plaque de cellulose est divisée en bandes de 1 cm. La poudre de chaque bande est collectée et suspendue pendant 15 h à 4°C dans 1 ml d'acide acétique à 0,5 %. Après centrifugation de la poudre, la radioactivité (●) et l'activité biologique (○) mesurée par l'activation de l'adényl cyclase de membranes de rein de porc sont déterminées dans les échantillons successifs.

La lysine vasopressine tritiée est ensuite éluée par de l'acide formique 0,1N. Nous avons vérifié la pureté radiochimique de l'hormone en nous assurant que le comportement chromatographique des molécules tritiées était identique à celui des molécules non marquées (fig.6). Aucune impureté radiochimique n'est décelable sur le radiochromatogramme.

La figure n° 7 montre que la lysine-vasopressine tritiée stimule l'adényl cyclase des membranes plasmiques du rein de porc. En comparant les km "apparents" (le km est la concentration d'hormone qui donne 50% de l'activation maximale) de ces deux courbes, on peut calculer que l'activité de l'hormone marquée est de 269 U/mg. Son activité pressique chez le rat, mesurée selon la méthode décrite par Stürmer (70) est de 228±20 U/mg. La radioactivité spécifique est de 10 C/mMole (tableau 2). Une seule préparation de lysine-vasopressine tritiée a été utilisée pour ce travail.

2) Mesure de la concentration du complexe hormone marquée-récepteur.

- Sur la structure épithéliale isolée.

Seule la radioactivité fixée au niveau cellulaire doit être mesurée, aussi faut-il corriger la radioactivité totale contenue dans l'épithélium pour la radioactivité entraînée dans les espaces extracellulaires. La différence entre la radioactivité totale et la radioactivité extracellulaire est appelée radioactivité non-extracellulaire. Elle peut correspondre à de l'hormone fixée sur des sites de liaison, mais aussi à l'hormone ou un de ses métabolites contenus dans les cellules. Chacun des quatre ou six fragments découpés dans une seule assise épithéliale est monté entre deux chambres de plexiglass (voir p. 13). L'ocytocine $\left[{}^{3}H\right]$ est ajoutée du côté interne de l'épithélium en même temps que de l'inuline $\left[{}^{14}C\right]$ qui servira à mesurer le volume des espaces extracellulaires de la structure. Après des temps variables suivant l'addition d'hormone, ou après avoir enlevé l'hormone marquée du milieu et attendu la réversibilité complète de la réponse, l'épithélium est rapidement prélevé. Afin de réduire au maximum la radioactivité extra-

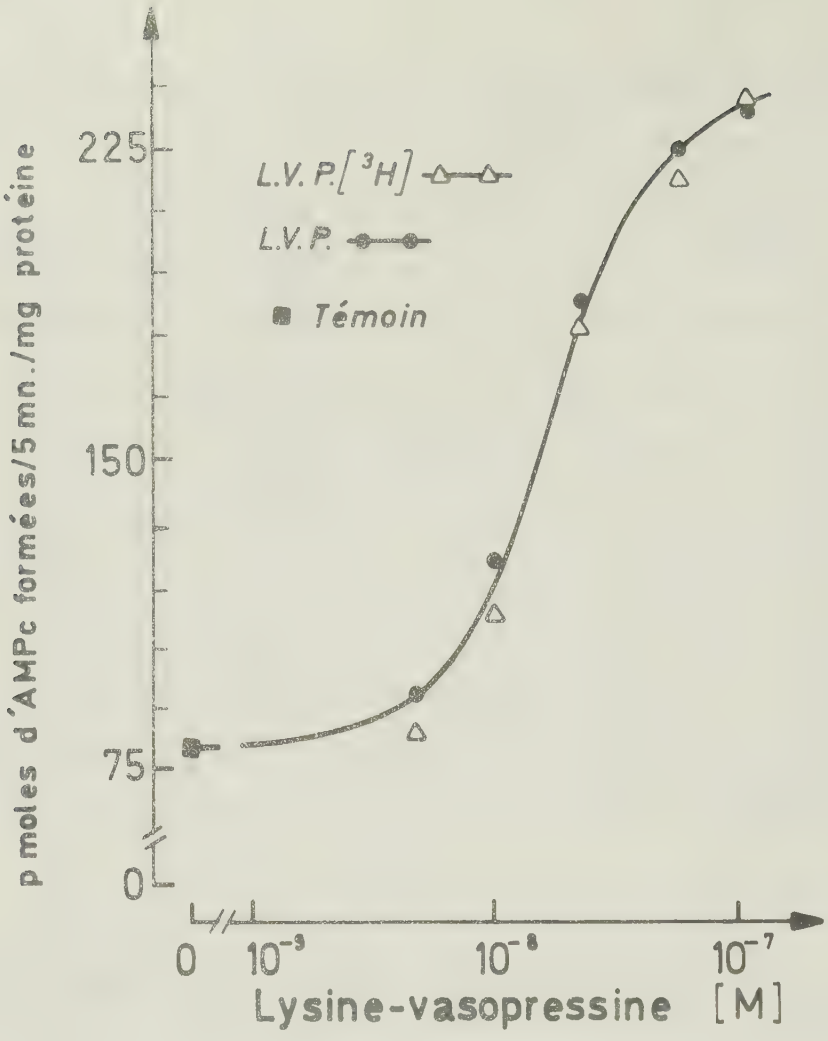


Figure 7 : ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE DE MEDULLAIRE DE REIN DE PORC PAR LA LYSINE-VASOPRESSINE[^{3}H] ET LA LYSINE-VASOPRESSINE NON MARQUEE

Les membranes (200 µg) sont incubées pendant 5 minutes à 30°C dans les conditions habituelles de mesure de l'activité adényl-cyclasique (voir "Méthodes"). Un système régénérateur d'ATP est présent. Chaque valeur est la moyenne de deux déterminations indépendantes. Une valeur moyenne de rendement est utilisée pour calculer les activités adényl-cyclasiques. La lysine-vasopressine tritiée est éluée avec l'AMP cyclique au cours de la séparation des nucléotides sur les colonnes d'oxyde d'aluminium. La faible différence d'activité observée aux concentrations de 5 X 10^{-9} et 10^{-8}M entre la lysine-vasopressine non marquée et la lysine vasopressine[^{3}H] peut être due à une variation dans le rendement de récupération.

TABLEAU N° 2 CARACTERISTIQUES DE L'OCYTOCINE ET DE LA LYSINE-VASOPRESSINE NATIVES, IODEES, ET TRITIEES.

	Maximum d'absorption du spectre U.V. (mμ)	ACTIVITES BIOLOGIQUES						
		"Avian-depressor" (U/mg)	Natriférique (U/mg)	Utérotonique chez le rat (U/mg)	Pressique chez le rat (U/mg)	Adényl-cyclasique (U/mg)		Radioactivité spécifique C/mMole
						Vessie des Amphibiens	Rein des Mammifères	
OCYTOCINE NATIVE	275	450 (1)	450 (1)	450 (1)		450 (1)		
OCYTOCINE IODEE	312	1	1	1		/		
OCYTOCINE TRITIEE	275	440 ± 24 (2) (n=6)	450	450 ± 10 (2) (n=4)		450 (3)		24
LYSINE-VASOPRESSINE NATIVE	275				285 [1]		285 [1]	
LYSINE-VASOPRESSINE IODEE	312				/		/	
LYSINE-VASOPRESSNE TRITIEE	275				228 ± 20 (2) (n=4)		269 (3)	10

Les résultats obtenus au cours d'une préparation d'ocytocine tritiée et d'une préparation de lysine-vasopressine tritiée sont présentées dans ce tableau. (1) valeurs de référence. (2) valeurs moyennes ± déviaton standard. (3) valeur moyenne déduite de la courbe dose-réponse de l'adényl cyclase (explication dans le texte)

cellulaire, le milieu séreux est rapidement enlevé. La chambre située du côté interne est rincée trois fois, chaque rinçage ne dure que 10 secondes. Il a été vérifié que ces rinçages éliminent la majorité de l'inuline [^{14}C] , sans modifier la radioactivité non-extracellulaire. L'épithélium est séché sur papier filtre, pesé dans des tubes tarés pour déterminer le poids frais, et solubilisé dans 0,5ml de soluène pendant 20 minutes à 70°c. Le matériel solubilisé est transféré dans 8ml d'une solution de Bray (56) et compté dans des conditions de discrimination entre le ^{14}C et le ^{3}H . 20µl du milieu d'incubation contenant l'ocytocine [^{3}H] et l'inuline [^{14}C] sont dilués dans 0,5ml de soluène et traités de la même façon que les échantillons. Ils servent de standard pour les calculs de la radioactivité fixée sur la structure ou contenue dans les espaces extracellulaires. Les résultats sont exprimés en p moles d'ocytocine fixées par gramme de poids frais.

- Sur les fractions membranaires.

La liaison des hormones neurohypophysaires tritiées aux fractions membranaires a été mesurée dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les mesures de l'activité adényl-cyclasique. Le milieu d'incubation (100µl) contient 100mM de TRIS-HCl pH 8, 10mM de $MgCl_2$, 0,25mM d'ATP, 1mM d'AMP cyclique, 50 à 200µg de protéines membranaires, et de l'hormone marquée (ocytocine ou vasopressine [^{3}H]). Nous n'avons pas introduit de système régénérateur d'ATP dans les conditions standards après avoir vérifié que les résultats étaient les mêmes en son absence. Deux techniques ont été utilisées pour séparer l'hormone marquée liée aux membranes, de l'hormone libre.

C e n t r i f u g a t i o n

Pour séparer l'ocytocine [H^3] libre de l'ocytocine [H^3] liée aux "ghosts", 75µl du milieu d'incubation sont déposés doucement sur 350µl d'une solution composée de 100mM de TRIS-HCl pH8 ; 10mM de $MgCl_2$, 5% de sérum albumine et 36% de sucrose, contenue dans des microtubes en plastique maintenus à 0°c (le volume de ces tubes est de 500µl, leur

hauteur de 4,5 cm et leur diamètre de 0,4 cm). Les tubes sont immédiatement centrifugés à 22 000 g dans une centrifugeuse Wifug pendant 4,5 minutes à 4°c. Ils sont ensuite congelés dans l'azote liquide. Les "ghosts" sont retrouvés au fond du tube. Ce dernier est découpé et placé pendant 20 minutes à 60°c dans 500µl de soluène. Le soluène est ensuite compté dans 8ml d'une solution de Bray (56). 20µl du milieu d'incubation sont traités comme les échantillons et servent de standard pour les calculs. Des échantillons témoins sans "ghosts" sont traités dans les mêmes conditions. La radioactivité trouvée au fond des tubes témoins n'excèdent pas la valeur du bruit de fond de l'appareil de comptage.

Séparation par filtration sur Millipore EAWP 0,45µ

A la fin de la période d'incubation 2ml d'une solution A, maintenue à 0°c et contenant 100mM de TRIS- HCl pH8 ; 10mM de $MgCl_2$; 0,25mM d'ATP et 1mM d'AMP cyclique, sont ajoutés aux 100µl du mélange réactionnel. Le tout est filtré sur millipore, préalablement rincé avec 5ml d'une solution B contenant 0,1% de sérum albumine, 10mM de TRIS-HCl pH8,0 et 1mM de $MgCl_2$. Les filtres sont alors lavés trois fois avec 10ml de cette solution B. Le temps qui s'écoule entre la fin de l'incubation et la fin de la filtration n'excède pas 30 secondes. Les filtres sont séchés et leur contenu en radioactivité est mesuré dans 8ml de liquide scintillant : 50 mg de 1,4-bis 2-(4 methyl-5-phenyloxazolyl) benzène ; 4 g de 2,5 diphényloxazol dans 1 litre de toluène. Des échantillons témoins sont traités dans les mêmes conditions. Toutes les valeurs sont les moyennes des mesures faites sur deux échantillons identiques. Il a été vérifié que le lavage des filtres par 30ml de solution B entraîne une élimination complète de la radioactivité libre sans libération importante de la radioactivité fixée aux membranes. A titre d'exemple les quantités apparentes d'hormone fixée, mesurées après rinçage par 10, 20 et 30 ml de solution B sur trois échantillons identiques incubés en présence de lysine-vasopressine $[^3H]$ ($2,5 \times 10^{-8}$M), sont respectivement de 0,688 ; 0,670 et 0,633 pmoles. Les valeurs témoins correspondantes (en l'absence de membranes) sont de 0,039 ; 0,036 et 0,035 pmoles.

CHAPITRE DEUXIEME

IDENTIFICATION DU RECEPTEUR MOLECULAIRE DE L'OCYTOCINE DES CELLULES EPITHELIALES DE LA PEAU ET DE LA VESSIE DES AMPHIBIENS

A) INTRODUCTION

Si l'étude de la liaison entre les hormones polypeptidiques marquées et leurs cellules réceptrices a commencé il y a une vingtaine d'années, elle ne s'est vraiment développée que récemment. Déjà en 1951, Stadie et al (72) en utilisant de l'insuline marquée à l'iode ^{125}I ou au soufre ^{35}S avaient tenté de déterminer le nombre de récepteurs de l'insuline du diaphragme de rat maintenu en survie in vitro. Le relatif échec de leurs expériences était probablement dû à la tendance de l'insuline, comme de nombreuses hormones polypeptidiques, à s'absorber non spécifiquement sur les tissus (73), et au fait que ces auteurs utilisaient des doses trop élevées d'hormone.

Les difficultés rencontrées dans l'interprétation d'études de ce type tiennent au fait qu'il n'existe pas de critère absolu permettant de distinguer les sites de fixation impliqués dans la réponse physiologique étudiée (que nous désignerons sous le nom de sites spécifiques) d'autres sites de fixation (sites non spécifiques) non impliqués dans la réponse physiologique. En pratique, l'établissement de corrélations multiples entre la fixation de l'hormone et la réponse biologique est indispensable à l'identification des sites récepteurs spécifiques. Dans le cas des peptides neurohypophysaires, l'activation de l'adényl cyclase constitue a priori la mesure la plus directe de l'efficacité de l'interaction hormone-récepteur. Toutefois, comme l'illustre la figure 8, la sensibilité à l'ocytocine des cellules épithéliales de la vessie intacte est 10 à 50 fois supérieure à la sensibilité de l'adényl cyclase présente dans les "ghosts" préparés à partir de ces cellules. Une telle différence de sensibilité entre les systèmes intacts et les systèmes acellulaires

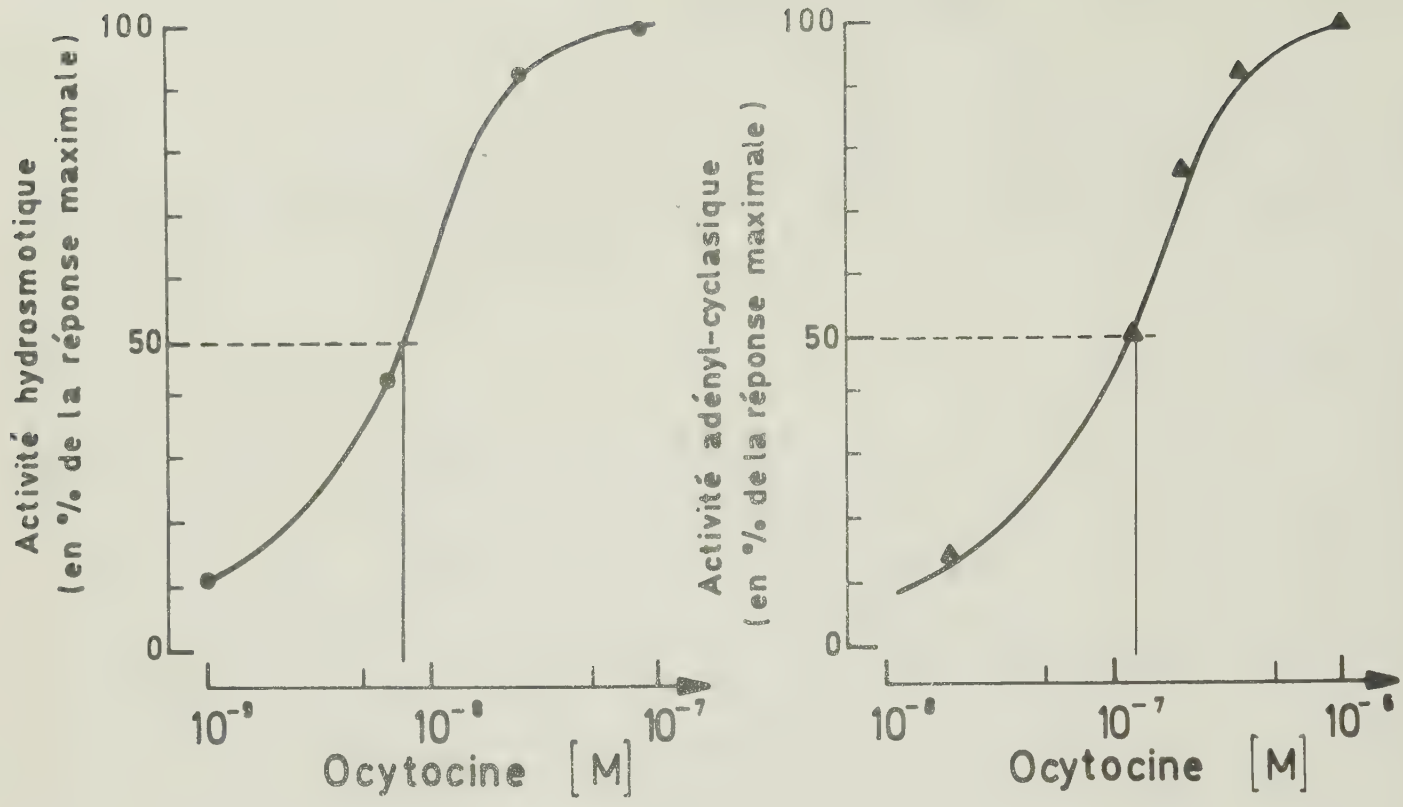


Figure 8 : ACTIVITES HYDROSMOTIQUES DE LA VESSIE DE GRENOUILLE (partie de gauche) ET ADENYL-CYCLASIQUES DES "GHOSTS" DE CELLULES EPITHELIALES DE LA VESSIE DE GRENOUILLE (partie de droite) MESUREES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'OCYTOCINE DANS LE MILIEU

- partie de gauche: l'effet hydrosmotique (en ordonnées) est mesuré selon la technique de Bourguet et Jard (74). Elle consiste à mesurer l'augmentation du flux net d'eau, traversant la vessie isolée de grenouille, placée entre deux milieux de pression osmotique différente.

- partie de droite: les activités adényl-cyclasiques (en ordonnées) sont mesurées selon la technique décrite dans le chapitre "Méthodologie". Les incubations sont réalisées à 37°C pendant 3 minutes, en présence d'un système régénérateur d'ATP et de 1,1 mg/ml d'enzyme I.

Les valeurs des affinités "apparentes" sont indiquées par l'abscisse des lignes verticales. Elles sont égales à la concentration d'ocytocine pour laquelle on obtient 50% de l'effet hydrosmotique ou adényl-cyclasique maximal.

a été observée dans les organes "cibles" de nombreuses hormones peptidiques (75). Dans la mesure où cette différence pourrait traduire une altération des sites récepteurs de l'hormone, il nous a semblé indispensable, dans une première série d'expériences d'essayer de caractériser les sites récepteurs de l'ocytocine sur les cellules épithéliales intactes.

B) LES RECEPTEURS DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES IMPLIQUES DANS LE TRANSPORT ACTIF DE Na^+ ONT ETE MIS EN EVIDENCE SUR L'EPITHELIUM ISOLE DE LE PEAU DE GRENOUILLE.

Il fallait pour rechercher des récepteurs aux hormones neurohypophysaires sur une structure intacte, trouver un organe cible de ces hormones sur lequel on puisse mesurer simultanément la fixation de la radioactivité et la réponse physiologique. Nous avons choisi l'épithélium isolé de la peau de grenouille, car il contient peu de tissus extraépithéliaux (voir figure 1). La vessie des amphibiens aurait pu être un bon matériel, mais elle contient en plus d'une couche de cellules épithéliales, une lame conjonctive composée de nombreuses fibres musculaires. L'assise épithéliale de la vessie est difficile à séparer et perd une partie de ses propriétés lors de son isolement (76). L'épithélium isolé de le peau conserve par contre, l'ensemble de ses propriétés physiologiques (45 et méthodes).

1) Contrôles préliminaires.

Lorsque la fixation d'ocytocine $\left[^3H\right]$ est mesurée en fonction du temps qui suit l'addition d'hormone dans le milieu (figure 9, partie supérieure), la fixation non-extracellulaire de radioactivité ^3H peut être divisée en deux composantes. Une composante qui croît linéairement en fonction du temps, et une autre qui est rapidement saturée. En présence de puromycine (figure 9, partie inférieure), la composante linéaire disparaît et la fixation de radioactivité ^3H est

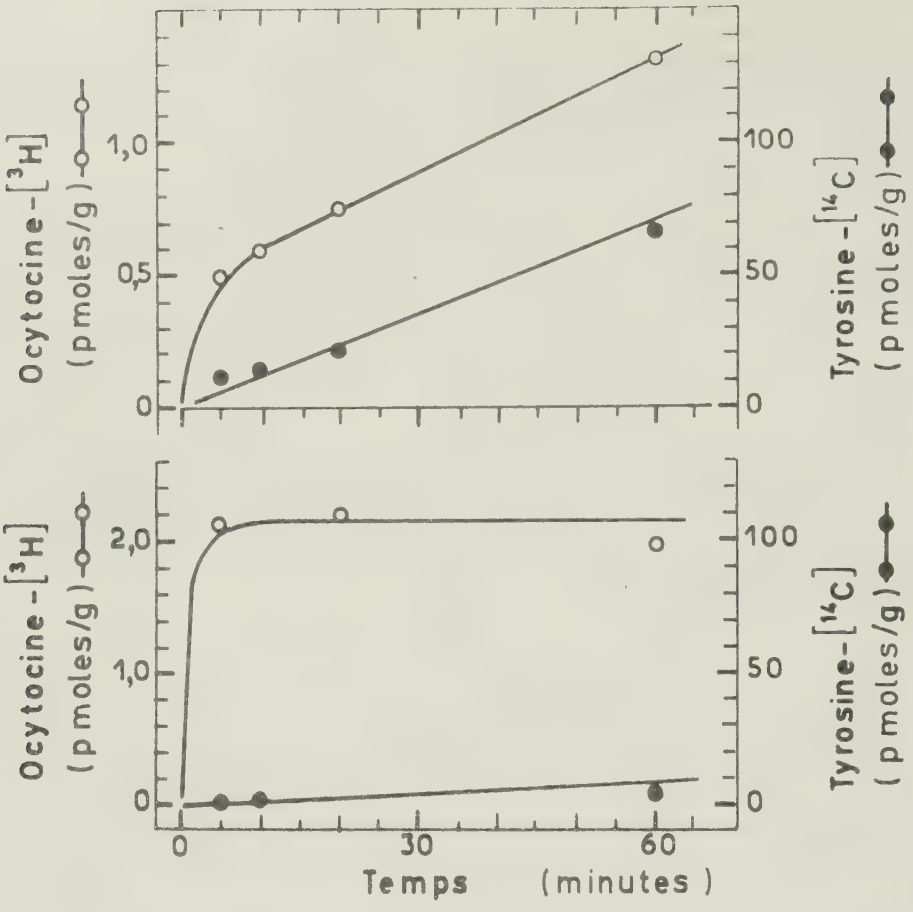


Figure 9 : EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS DE LA FIXATION D'OCYTOCINE $[^3H]$ ET DE L'INCORPORATION DE TYROSINE $[^{14}C]$ EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE PUROMYCINE

Pour chacune de ces deux expériences, des fragments du même épithélium sont utilisés. Les préparations sont incubées pendant 90 minutes, avec (partie inférieure)ou sans (partie supérieure)puromycine (200 µg/ml). L'ocytocine $[^3H]$ 11 nM et la tyrosine $[^{14}C]$ 11nM sont ajoutés du côté interne de l'épithélium. Après les temps indiqués, les fragments sont prélevés et leur contenu en radioactivité $[^3H]$ et $[^{14}C]$ est déterminé. Cette figure illustre la variabilité, d'un épithélium à l'autre, de la fixation saturable (voir aussi le tableau n° 32).

maximale après 5 minutes. Dans chacune de ces expériences, de la tyrosine $[^{14}C]$ est introduite en même temps que l'ocytocine $[^{3}H]$ et le contenu non extracellulaire en radioactivité ^{14}C est déterminé. En présence de puromycine, le contenu intracellulaire en ^{14}C est très faible. En absence de puromycine, il croît linéairement en fonction du temps. Ceci suggère que l'épithélium est le siège d'une synthèse de protéines dans lesquelles la tyrosine $[^{14}C]$ est incorporée. Le fait que la puromycine, qui est un inhibiteur de la synthèse des protéines, inhibe la composante linéaire de fixation de la radioactivité ^{3}H, permet de penser que celle-ci résulte de l'incorporation d'un acide aminé marqué provenant de l'ocytocine. La méthode de préparation de l'ocytocine $[^{3}H]$ consiste, rappelons-le, à ioder le radical tyrosyl de l'hormone puis à remplacer l'iode par du tritium. Cette hypothèse est en accord avec le fait que l'addition de tyrosine ($10^{-3}M$) non marquée dans le milieu supprime également la composante de fixation linéaire. Dans toutes les expériences réalisées sur la structure intacte, cette composante sera inhibée par la présence de puromycine (200 µg/ml), de tyrosine non marquée ($10^{-3}M$) ou de tyrosine non marquée et de cycloheximide (20 µg/ml), un autre inhibiteur de la synthèse des protéines.

2) Mise en évidence des récepteurs spécifiques de l'ocytocine $[^{3}H]$

La fixation d'ocytocine $[^{3}H]$ est un processus limité dans le temps tendant vers une valeur d'équilibre. La figure n° 10 montre les résultats d'une expérience au cours de laquelle nous avons comparé, sur des fragments d'épithélium de la même peau, les évolutions dans le temps de la fixation d'ocytocine ^{3}H et de la réponse natriférique (mesurée par l'accroissement de d.d.p.). La fixation et la réponse sont des processus limités dans le temps. Deux minutes après l'addition d'hormone, la fixation est égale à 70% de sa valeur maximale. La fixation précède le développement de la réponse. La valeur d'équilibre de la fixation est atteinte après 20 minutes environ, temps nécessaire pour obtenir le maximum de la réponse biologique.

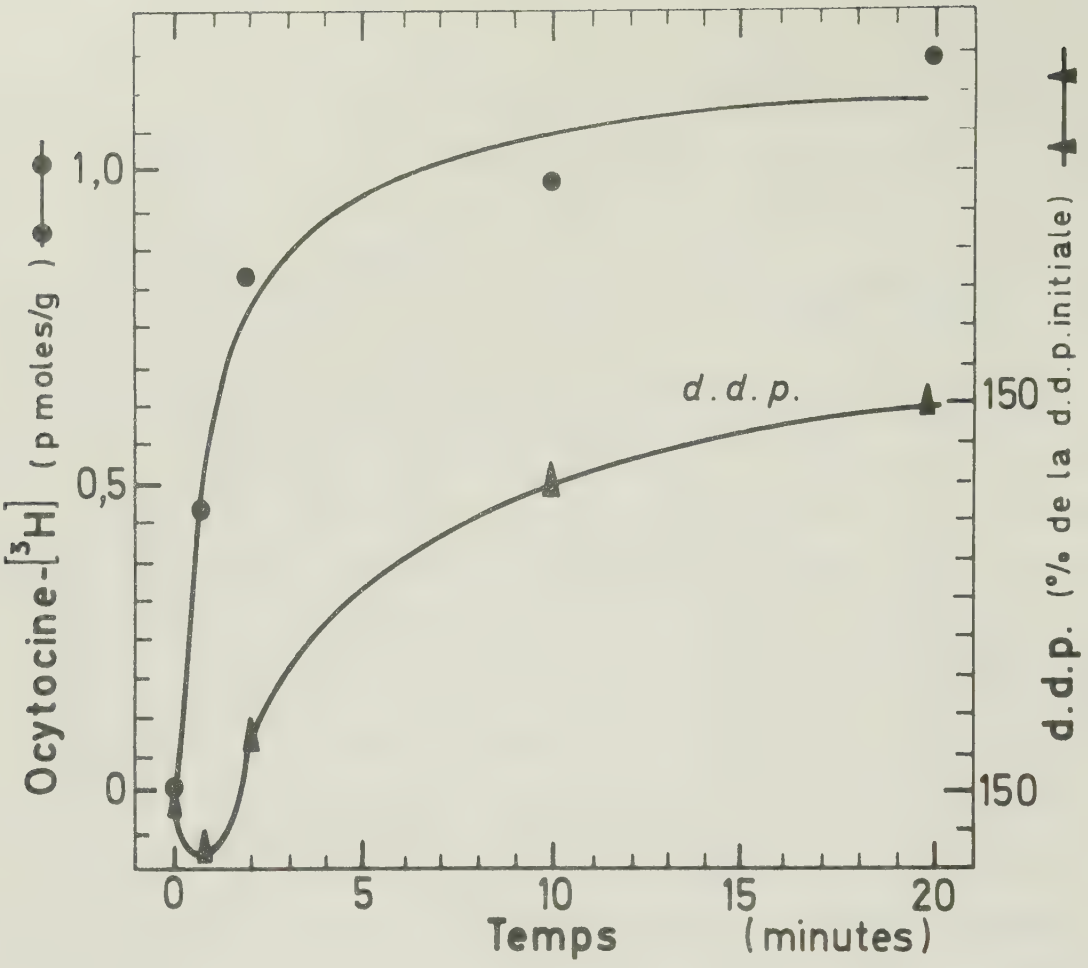


Figure 10 : EVOLUTIONS EN FONCTION DU TEMPS DE LA FIXATION D'OCYTOCINE $[^3H]$ ET DE LA REPONSE BIOLOGIQUE

Quatre fragments du même épithélium sont préincubés pendant 90 minutes en présence de cycloheximide (20 µg/ml) et de tyrosine non marquée (1 mM). La différence de potentiel (d.d.p.) de chacun de ces fragments est enregistrée de façon continue. Au temps 0, l'ocytocine $[^3H]$ (11 nM) est ajoutée. Les quatre fragments sont prélevés respectivement après 0,75 ; 2 ; 10 et 20 minutes. La radioactivité non extracellulaire est déterminée en soustrayant, de la radioactivité totale fixée sur la structure, la radioactivité contenue dans les espaces extracellulaires (voir "Méthodes").

En ordonnées : la fixation d'ocytocine $[^3H]$ non extracellulaire exprimée en pmoles d'hormone fixée par g de poids frais.

En abscisses : le temps d'incubation.

TABLEAU N° 3 REVERSIBILITE DE LA FIXATION D'OCYTOCINE [^{3}H] SUR L'EPITHELIUM ISOLE.

Des fragments symétriques sont incubés pendant 90 minutes en présence de cycloheximide (20µg) et de tyrosine non marquée(1mM) .L'ocytocine ^{3}H, 11nM est alors ajoutée . Au maximum de l'augmentation de la différence de potentiel ,le fragment témoin est prélevé.Le fragment expérimental est rincé toutes les 5minutes avec un milieu ne contenant pas d'hormone mais dans lequel on a gardé la même concentration de cycloheximide et de tyrosine . Il est prélevé aprés réversibilité compléte de la réponse (soit environ 30 minutes).Dans les trois derniéres expériences, on a ajouté du dithiotréitol(10mM) au milieu de rinçage.

Traitement	Radioactivité (p moles/g)		°/o de Réversibilité $100\left(1-\frac{\text{expérimental}}{\text{témoin}}\right)$
	Fragment témoin	Fragment expérimental	
Cycloheximide +tyrosine	0,59	0,18	68
	0,59	0,16	73
	0,64	0,27	58
	1,10	0,40	64
	1,90	0,36	81
	1,76	0,90	50
	1,26	0,67	47
	1,71	0,95	45
	2,80	1,07	64
	1,58	0,40	75
	1,24	0,63	50
			61 ± 12[a]
Cycloheximide +tyrosine +dithiotréitol	1,19	0,13	93
	2,20	0,14	94
	1,80	0,10	94
			94 ±1 [a]

a Moyenne ± déviation standard

- Réversibilité de la fixation :

Des fragments symétriques d'épithélium, découpés à partir d'une même assise épithéliale sont incubés en présence d'ocytocine $[^3H]$ (11×10^{-9}M) dans une solution de Ringer contenant de la cycloheximide et de la tyrosine non marquée. Au maximun de la réponse biologique l'un des fragments (témoin) est prélevé et son contenu en radioactivité déterminé. L'autre fragment (expérimental) est rincé toutes les cinq minutes avec un milieu identique au milieu d'incubation mais ne contenant pas d'hormone. Lorsque le transport de Na^+ est revenu à son niveau de base, le fragment expérimental est prélevé. Quelle que soit la quantité de radioactivité fixée dans la phase initiale de l'expérience, une fraction sensiblement constante (60%) de cette radioactivité est libérée (tableau 3). Il reste donc une composante de fixation non réversible par suppression de l'hormone dans le milieu d'incubation. La radioactivité résiduelle peut être libérée si l'on ajoute du dithiothreitol (un agent réducteur des ponts -S-S-) au milieu de rinçage (tableau 3). La présence de dithiothreitol ne perturbe pas la vitesse de réversibilité de l'action hormonale.

- Saturabilité de la fixation en fonction de la concentration d'ocytocine $[^3H]$.

Dans une première série d'expériences, nous avons mesuré la fixation pour des concentrations sub-maximales d'hormone (de 10^{-9}M à 10^{-8}M). La figure n° 11 montre que la fixation d'ocytocine $[^3H]$ et la réponse physiologique sont détectables pour le même seuil de concentration (10^{-9}M). Comme la réponse natriférique, la fixation est saturable en fonction de la dose d'ocytocine $[H^3]$. La concentration hormonale qui donne 50% de la réponse physiologique maximale (affinité "apparente" km_B) est très voisine de celle pour laquelle on mesure 50% de la fixation maximale (km_F). Le tableau n° 4 permet de comparer les valeurs des km_B et km_F "apparents" mesurés sur plusieurs épithéliums. Une variation assez importante est observée d'une épithélium à l'autre, mais pour une même structure, les valeurs de km_B et km_F sont similaires.

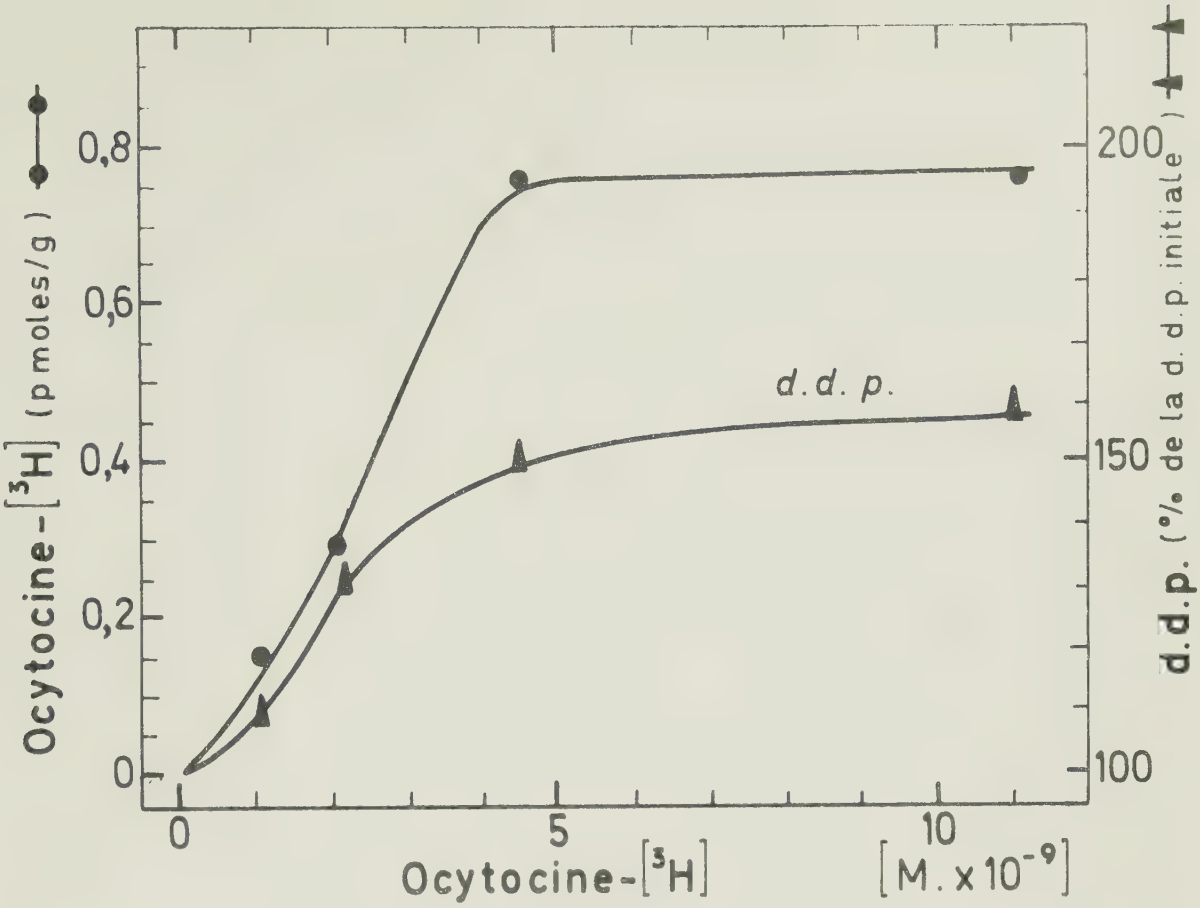


Figure 11 : FIXATION D'OCYTOCINE TRITIEE ET REPONSE BIOLOGIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'OCYTOCINE $[^3H]$. (Les concentrations varient de 10^{-9} à 10^{-8}M)

Quatre fragments du même épithélium sont préincubés pendant 90 minutes en présence de cycloheximide (20 µg/ml) et de tyrosine non marquée (1 mM). Au temps 0 chaque fragment reçoit l'ocytocine $[^3H]$. L'incubation dure 20 minutes. Ce temps est suffisant pour assurer un développement complet de la réponse, même aux plus faibles concentrations d'hormone marquée.

En ordonnées: la fixation d'ocytocine $[^3H]$ non extracellulaire, exprimée en pmoles d'hormone fixée par g de poids frais.

En abscisses: la concentration d'hormone dans le milieu d'incubation.

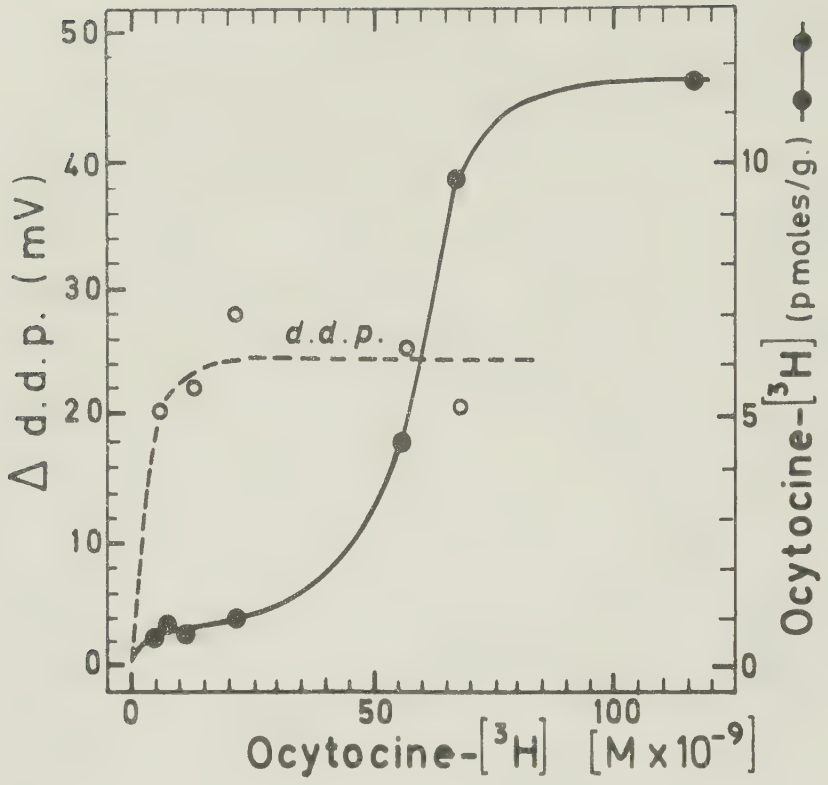


Figure 12 : FIXATION D'OCYTOCINE TRITIEE ET REPONSE BIOLOGIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'OCYTOCINE $[^3H]$ (Les concentrations varient de 10^{-9} à 1,2 X 10^{-7}M)

Nous avons utilisé pour cette expérience les fragments de deux assises épithéliales présentant la même sensibilité à l'ocytocine. Les fragments sont préincubés pendant 90 minutes en présence de cycloheximide (20 µg/ml) et de tyrosine non marquée. Au temps 0 chaque fragment reçoit de l'ocytocine $[^3H]$. Il est prélevé 20 minutes plus tard. La courbe de fixation présente deux plateaux de saturation. La réponse natriférique maximale est obtenue pour des concentrations d'ocytocine $[^3H]$ voisines de 10^{-8}M (concentration pour laquelle le premier plateau de saturation est atteint).

Dans une deuxième série d'expériences, la fixation d'ocytocine $[^3H]$ a été mesurée pour des concentrations sub. et supra maximales d'hormone (figure 12). On observe un premier plateau de saturation (entre 5 x 10^{-9}M et 1,5 x 10^{-8}M) correspondant à celui décrit dans les expériences précédentes.

Tableau n° 4 Comparaison des valeurs de km_B et km_F déterminés à partir des courbes doses-réponse biologique et des courbes de fixation.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles définies pour la figure 11.

Expérience	Km_B	Km_F
	nM	nM
1	3.6	3.1
2	2.0	2.6
3	9.7	4.4
4	7.7	5.5

La réponse natriférique mesurée sur les mêmes fragments est maximale à 5 x 10^{-9}M environ. Au delà de 1,5 x 10^{-8}M, la fixation de radioactivité augmente assez rapidement et un deuxième plateau de saturation est atteint pour une concentration de 7,5 x 10^{-8}M. Ces deux plateaux de saturation laissent supposer la présence sur l'épithélium isolé, de deux catégories de sites de fixation qui diffèrent à la fois par leur capacité maximale de fixation et par leur affinité "apparente" pour l'hormone.

- Spécificité des sites de fixation à haute affinité

Déplacement d'analogues non marqués par l'ocytocine $[^3H]$.

Des fragments symétriques d'épithélium sont utilisés. Le fragment témoin reçoit 5,5nM d'ocytocine non marquée (450 U natriférique/mg). Cette concentration assure une saturation complète des sites à haute

TABLEAU N° 5 FIXATION DE L'OCYTOCINE [^{3}H] EN PRESENCE DE LYSINE-VASOPRESSINE OU D'ARGININE^8-OCYTOCINE.

Des fragments symétriques d'épithélium sont utilisés. L'incorporation de tyrosine [^{3}H] dans les protéines est bloquée par une préincubation de 90 minutes en présence de cycloheximine (20µg/ml) et de tyrosine non marquée (1mM). Les fragments témoins reçoivent de l'ocytocine non marquée (5,5nM) pendant 20 minutes. Les fragments expérimentaux reçoivent la même concentration de lysine-vasopressine (expérience 1-4) ou de l'arginine^{8}ocytocine (expérience 5-8). Toutes les préparations reçoivent ensuite 5,5nM d'ocytocine ^{3}H pendant une période supplémentaire de 20 minutes. Pour les fragments témoins qui reçoivent de l'ocytocine non marquée on a tenu compte dans les calculs de la radioactivité spécifique finale de l'ocytocine (=1/2 de la radioacticité spécifique initiale)

Expérience N°	Radioactivité fixée (cpm/g)		Ocytocine fixée (p moles/g)		Rapport Expérimental* / Témoin*
	Fragment témoin	Fragment expérimental	Fragment témoin*	Fragment expérimental*	
1	2,872	6,485	0,62	0,70	1,10
2	7,133	15,748	1,54	1,70	1,10
3	3,520	4,817	0,76	0,52	0,70
4	2,689	7,133	0,58	0,77	1,35
					1,06 ± 0,27 [a]
5	4,076	4,076	0,88	0,44	0,50
6	4,540	4,446	0,98	0,48	0,49
7	7,411	7,596	1,60	0,82	0,51
8	4,446	5,373	0,98	0,58	0,59
					0,52 ± 0,05 [a]

a Moyenne ± déviation standard

affinité. Le fragment expérimental reçoit 5,5nM de lysine-vasopressine (8 U natriférigues/mg) (77) ou 5,5nM d'arginine-8-ocytocine (1100 U natriférigues/mg(77). A cette concentration la lysine-vasopressine ne stimule par le transport de Na^+, tandis que l'arginine.8.ocytocine produit une réponse maximale. Après développement complet de la réponse physiologique, on ajoute 5,5nM d'ocytocine $[^3H]$ aux fragments témoins ou expérimentaux. Ils sont prélevés 20 minutes après. Les résultats obtenus (tableau 5) montrent que la préincubation des fragments témoins en présence d'ocytocine non marquée en concentration saturante, n'empêche pas la fixation ultérieure d'ocytocine $[^3H]$. Les molécules d'hormone fixées sont donc l'objet d'un renouvellement à partir des molécules libres du milieu d'incubation. Pour le calcul de la quantité d'ocytocine fixée, nous avons admis qu'un équilibre de radioactivité spécifique est réalisé entre l'hormone fixée et l'hormone libre. Les résultats (tableau 5, 4ème colonne) sont comparables à ceux obtenus lorsque l'épithélium est incubé en présence de 11nM d'ocytocine $[^3H]$, ajoutées au début de l'expérience (cf.tableau 3).

Lorsque la préparation est incubée en présence de lysine-vasopressine non marquée, la fixation ultérieure de radioactivité est plus importante que lorsque la préincubation est effectuée en présence d'ocytocine non marquée. Cette observation indique qu'à l'équilibre une fraction très faible des sites est occupée par les molécules de lysine-vasopressine. Le calcul des quantités d'ocytocine fixées montre que la présence de vasopressine n'affecte pas significativement la fixation d'ocytocine. La vasopressine qui a une très faible activité natriférique a donc peu d'affinité pour les sites récepteurs de l'épithélium isolé.

L'arginine ^{8} ocytocine qui a une activité natriférique élevée se comporte comme l'ocytocine non marquée et occupe à l'équilibre 50% environ des sites (tableau 5). Les récepteurs de l'épithélium isolé ont donc, comme les récepteurs impliqués dans la réponse natriférique aux peptides neurohypophysaires, une affinité élevée pour l'ocytocine et l'arginine ^{8}-ocytocine et une affinité faible pour la lysine-vasopressine.

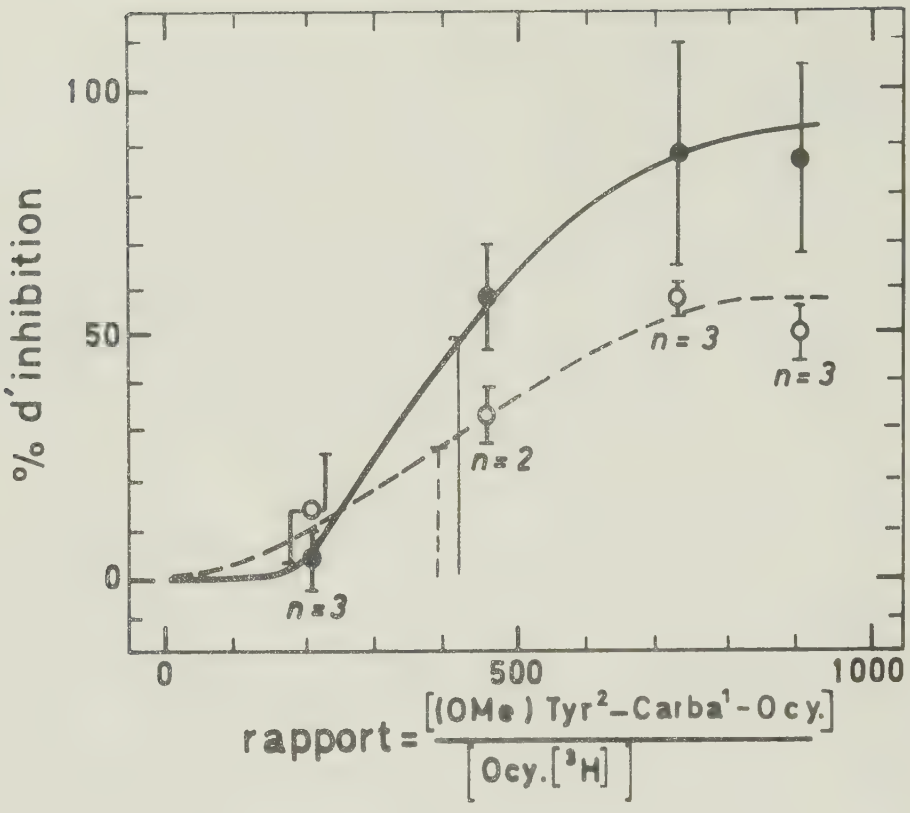


Figure 13 : INHIBITION PAR L'O-METHYL TYROSINE-CARBA-1 OCYTOCINE DE LA FIXATION ET DE L'ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE DE L'OCYTOCINE $[^3H]$

Des fragments d'épithélium symétriques par rapport à l'axe antéro-postérieur sont utilisés. Les fragments témoins de chaque paire reçoivent une dose d'ocytocine $[^3H]$ donnant une réponse sub-maximale. Les fragments expérimentaux reçoivent de l'ocytocine $[^3H]$, plus des quantités variables d'analogue. L'O-méthyl tyrosine-carba-1 ocytocine est un inhibiteur compétitif de l'ocytocine n'ayant pas d'activité natriférique (○). Les incubations sont faites pendant 20 minutes. Pour chaque paire, les pourcentages d'inhibition de la fixation (○) et de la réponse natriférique (●) sont calculés et portés en fonction du rapport entre les concentrations d'analogue et d'ocytocine $[^3H]$. Quatre rapports ont été choisis: 200, 475, 750 et 900. Les lignes verticales en traits pleins et en traits pointillés indiquent les rapports respectifs pour lesquels on obtient 50% d'inhibition de la réponse physiologique maximale, et 50% d'inhibition de la fixation maximale d'ocytocine $[^3H]$.

Compétition entre l'ocytocine ^{3}H et l'O-méthyl tyrosine^{2}-carba 1 ocytocine

L'O-méthyl tyrosine^{2}-carba-1 ocytocine est un analogue inactif de l'ocytocine se comportant comme un inhibiteur compétitif de l'ocytocine sur la peau de grenouille (78). Nous avons recherché si cet analogue est également capable d'entrer en compétition avec l'ocytocine $[^{3}H]$ pour la fixation sur les sites récepteurs de l'épithélium isolé. Des couples de fragments symétriques ont été utilisés. Le fragment expérimental reçoit de l'O-méthyl-tyrosine-carba-1 ocytocine et de l'ocytocine $[^{3}H]$ (à une concentration de 4.4 à 11 x 10^{-9}M selon la sensibilité de l'épithélium). Le fragment témoin ne reçoit que l'ocytocine ^{3}H . La concentration d'analogue est choisie pour obtenir des rapports de concentrations entre l'O-méthyl-tyrosine^{2}-carba^{1}-ocytocine et l'ocytocine $[^{3}H]$ de 200,475, 750 ou 900. Les fragments sont prélevés au maximum de la réponse biologique. Pour chaque couple de fragments, les pourcentages d'inhibition de la fixation d'ocytocine ^{3}H et de son effet natriférique sont calculés. Les inhibitions de la fixation et de la réponse biologique, produites par cet analogue non marqué, sont comparées dans la figure 13. Il y a une bonne corrélation entre ces inhibitions ($r = 0,883$; $P < 0,01$). On obtient 50% de l'inhibition maximale de la fixation et 50% de l'inhibition de la réponse natriférique maximale pour des rapports de concentrations très voisins. On peut cependant remarquer que l'on obtient une inhibition complète de la réponse physiologique pour une inhibition de 60% de la fixation d'ocytocine $[^{3}H]$.

3) Discussion

La stimulation du transport actif de sodium par des doses submaximales d'ocytocine $[^{3}H]$ s'accompagne d'une fixation de radioactivité sur la structure épithéliale. Cette fixation peut être décrite comme la somme de trois composantes principales :

- la première correspond vraisemblablement à l'incorporation de

tyrosine [^{3}H] dans les protéines nouvellement synthétisées En effet, il est possible de la supprimer en ajoutant au milieu qui baigne la face interne de l'épithélium, des inhibiteurs de la synthèse des proteines (puromycine 200 µg/ml ou cycloheximide 20 µg/ml), ou de la tyrosine non marquée (1mM). L'origine de la tyrosine [^{3}H] n'a pas été recherchée dans nos expériences. Il est vraisemblable que l'hormone puisse être rapidement hydrolysée au contact de l'épithélium, ou après avoir pénétré dans la structure. Willunsen et Bie (79) ont observé, que 2 minutes après l'injection intraveineuse à des rats de lysine-vasopressine marquée sur le radical tyrosine, le rapport tyrosine [^{3}H]/peptide [^{3}H] était de 1. La présence dans la vessie de crapaud, de peptidases intracellulaires catalysant la destruction de l'ADH, a été décrite (80). Récemment, Soloff et al (81), utilisant la même préparation d'ocytocine [^{3}H] que celle que nous avons employée dans ce travail, ont décrit la fixation de radioactivité par des fragments de glande mammaire. Cette fixation croît linéairement en fonction du temps, il est possible qu'elle soit en grande partie le résultat d'une incorporation de tyrosine [^{3}H] dans les protéines. Toutefois, ces résultats comme les nôtres, pourraient être expliqués si l'on suppose une contamination de moins de 0,1% de l'ocytocine [^{3}H] par de la tyrosine [^{3}H] . Une telle contamination est cependant improbable si l'on se rappelle les techniques utilisées pour préparer l'hormone marquée - (voir méthodes). Cette composante bien qu'importante, (elle peut représenter 40% de la fixation totale après 30 minutes d'incubation) a été supprimée dans toutes les expériences suivantes. Les inhibiteurs de la synthèse des protéines employés ne modifient pas la réponse natrifériqué à l'ocytocine, comme l'avait déjà noté Edelman et al (83).

- la fixation que l'on peut mesurer en l'absence de synthèse des protéines, est elle-même la somme de deux composantes de nature différente . L'un d'elle est réversible lorsqu'on enlève l'hormone du du milieu (voir tableau 2) et que l'on attend la disparition de l'effet stimulateur de l'hormone. L'autre est irréversible dans ces conditions.

Si l'on ajoute 10mM de dithiothreitol au milieu de rinçage, la plus grande partie (85%) de cette composante irréversible qui représente 40% de la fixation totale peut être libérée de la structure. Cette expérience suggère qu'une partie de l'hormone se fixe de façon covalente sur la structure par formation de ponts disulfures entre la molécule d'ocytocine et les groupes SH libres des protéines de l'épithélium. Une telle réaction a été observée par Fong et al (83) (84), puis par Schwartz et al (85) entre l'ADH tritiée et des fractions particulaires de rein de rat ou de vessie de crapaud. Une question importante est de savoir si cette réaction est impliquée dans le mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires comme ces auteurs l'avaient proposé (83, 84, 85). L'O-méthyl tyrosine ^{2}-carba-1-ocytocine est un analogue de l'ocytocine possédant à la place d'un pont disulfure, un pont mixte formé d'un atome de soufre en position 6 et d'un radical méthyl en position 1, (78). Le fait que cet analogue inhibe complètement la réponse natriférique de l'ocytocine d'une façon compétitive, suggère fortement que le pont disulfure de l'ocytocine n'est pas indispensable à la fixation de l'hormone sur son récepteur. De plus, seulement 60% de la radioactivité fixée en absence de synthèse des protéines peut être déplacée par cet analogue. On peut donc supposer que la radioactivité restante n'est pas impliquée dans la réponse biologique et correspond à de l'hormone liée à la structure par l'intermédiaire de ponts -S-S- . Cette hypothèse est en accord avec l'observation faite par de nombreux auteurs que les analogues de l'ocytocine dont le pont disulfure est remplacé par un pont CH_2-CH_2, conservent une activité biologique notable (86,87,88). De même, la seleno-ocytocine (dans laquelle le soufre du pont -S-S- est remplacé par du sélénium) présente une activité utérotonique aussi grande que celle de l'ocytocine (89).

La fixation résiduelle (60% de la fixation mesurée en présence d'inhibiteur des protéines) correspond vraisemblablement à la formation du complexe formé entre l'hormone et les récepteurs impliqués dans la réponse natriférique. La fixation sur ces sites atteint rapidement

un état d'équilibre après l'addition d'hormone au milieu d'incubation et précède le développement de la réponse physiologique. La concentration d'hormone pour laquelle 50% des sites sont saturés est très voisine de celle qui donne 50% de la réponse physiologique maximale. La valeur du km de fixation est compris entre 2 et 5 x 10^{-9}M. La capacité de liaison varie entre 0,5 et 2p moles/g. Une bonne corrélation existe entre les activités natriférigues respectives de la lysine-vasopressine de l'ocytocine et de l'arginine ^{8}-ocytocine et leurs affinités pour les sites de fixation.

L'estimation précise du nombre et de l'affinité pour l'ocytocine des sites récepteurs impliqués dans la réponse biologique est rendue difficile par le fait que dans nos conditions expérimentales la composante irréversible de la fixation n'a pas été dissociée de la composante spécifique. On peut néanmoins estimer à environ 1000 sites par cellule le nombre de sites impliqués dans le mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires sur la peau de grenouille.

Si l'on mesure la fixation de l'ocytocine [^{3}H] sur l'épithélium isolé pour des concentrations d'ocytocine [^{3}H] supérieures à celles qui donnent la réponse natriférique ou hydrosmotique maximale (> à 10^{-8}M), on peut mettre en évidence une deuxième catégorie de sites de fixation. Ces sites ont une plus faible affinité ($5x10^{-8}$M) et une plus haute capacité de liaison que les sites récepteurs impliqués dans l'effet physiologique (10 p moles/g). Le rôle physiologique éventuel de ces sites n'est pas évident. Deux remarques peuvent être faites à leur sujet. 1) il est difficile d'admettre qu'ils constituent des récepteurs de réserve au sens où les pharmacologistes, et en particulier Ariens, (90) l'entendent. L'existence des récepteurs de réserve signifie que l'on peut, avec un agoniste donné, obtenir une réponse biologique maximale pour une saturation partielle des sites récepteurs. Ces récepteurs constituent néanmoins une catégorie homogène de sites ayant tous la même affinité pour l'hormone. 2) ils ne peuvent être impliqués dans la perméabilisation osmotique à l'eau

non mesurée dans nos expériences, car cette réponse est obtenue pour les mêmes concentrations que celles qui sont actives sur le transport de Na^+. Bien entendu, ils pourraient être impliqués dans une action physiologique non connue des hormones neurohypophysaires.

C) MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS DE L'OCYTOCINE, IMPLIQUES DANS L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE

Les expériences que nous venons de décrire montrent qu'il est possible de détecter sur un système cellulaire intact, la présence de sites récepteurs impliqués dans la réponse physiologique de l'hormone. Elles sont aussi une illustration des difficultés rencontrées lorsque l'on veut étudier l'intéraction hormone-récepteur sur une structure épithéliale intacte. La présence d'une composante métabolique est un obstacle certain. De plus, la mesure de l'effet biologique final est sans aucun doute une conséquence trop lointaine de l'intéraction. Il doit être considéré avec réserves comme un critère valable du stimulus produit par cette intéraction et en particulier de la stimulation de l'adényl cyclase. Aussi, est-il indispensable d'étudier ces premières étapes du mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires sur un système acellulaire sur lequel on puisse mesurer l'activité adényl-cylasique. Une question importante est de savoir si la perte d'affinité "apparente" pour l'hormone, observée entre le système cellulaire et le système cyclasique acellulaire (figure 8) est due ou non à une perte d'affinité du récepteur lui-même. Aussi, avons-nous recherché sur des "ghosts" de cellules épithéliales de la vessie des amphibiens, la présence de récepteurs spécifiques à l'ocytocine $[^3H]$ qui pourraient être impliqués dans l'activation de l'adényl cyclase. Les cellules épithéliales de la vessie des amphibiens ont été choisies de préférence aux cellules épithéliales de la peau, car nos efforts, comme ceux d'autres auteurs cherchant à mesurer l'activité adényl-cyclasique sur ce système, ont été vains.

1) Définitions des conditions optimales pour la mesure de l'activité adényl-cyclasique

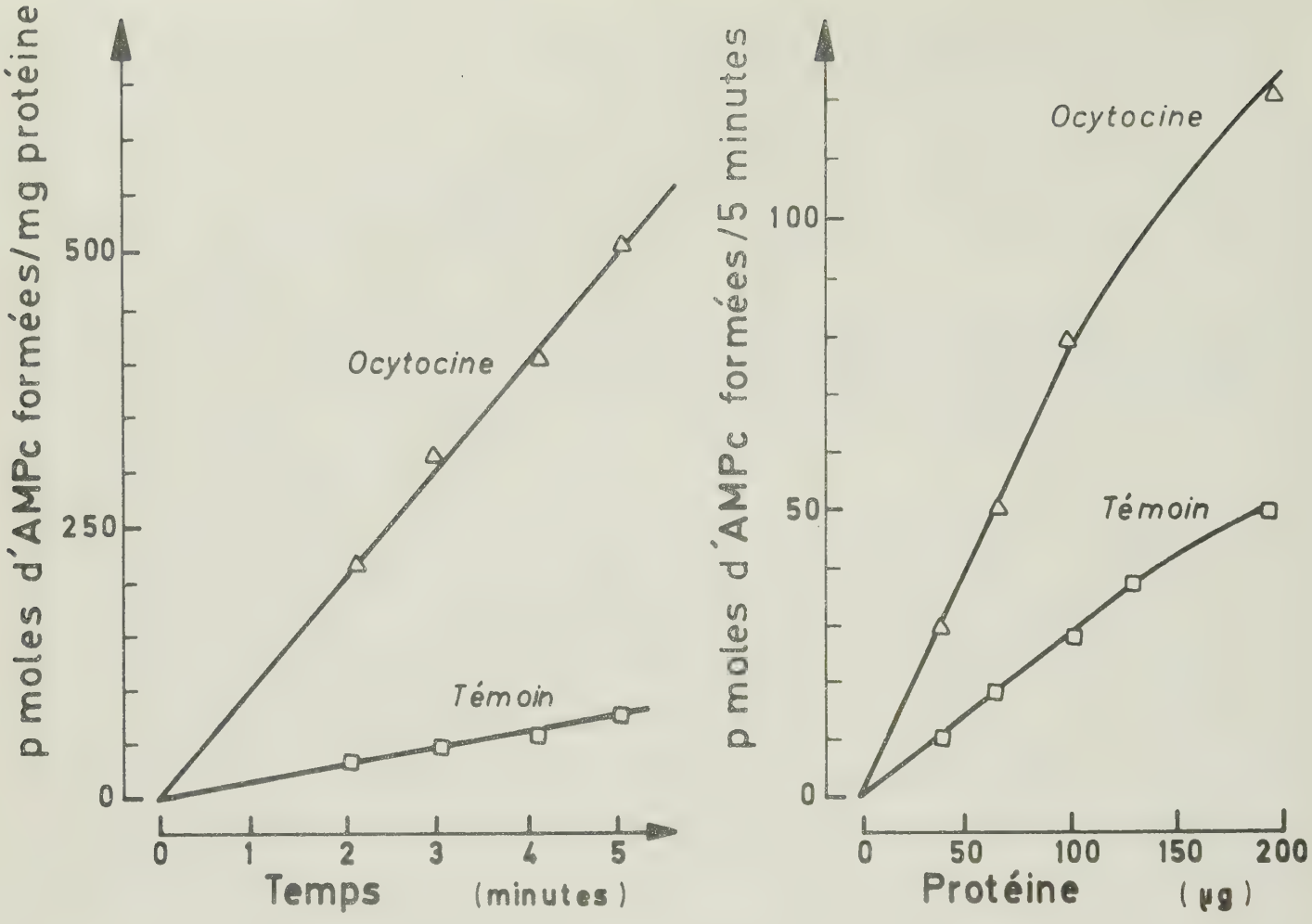


Figure 14 : ACCUMULATION DE L'AMPc FORME EN FONCTION DU TEMPS (PARTIE GAUCHE) ET DE LA CONCENTRATION DE PROTEINE (PARTIE DROITE)

Les incubations sont faites à 30°C, en absence (□) ou en présence (△) d'ocytocine (6×10^{-7}M). La concentration de protéine est de 0,920 mg d'enzyme I par ml pour la cinétique d'accumulation de l'AMPc. La valeur de chaque point est la moyenne de deux valeurs expérimentales. L'accumulation de l'AMPc formé est proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration de protéine (jusqu'à 100 µg pour 100 µl de milieu d'incubation).

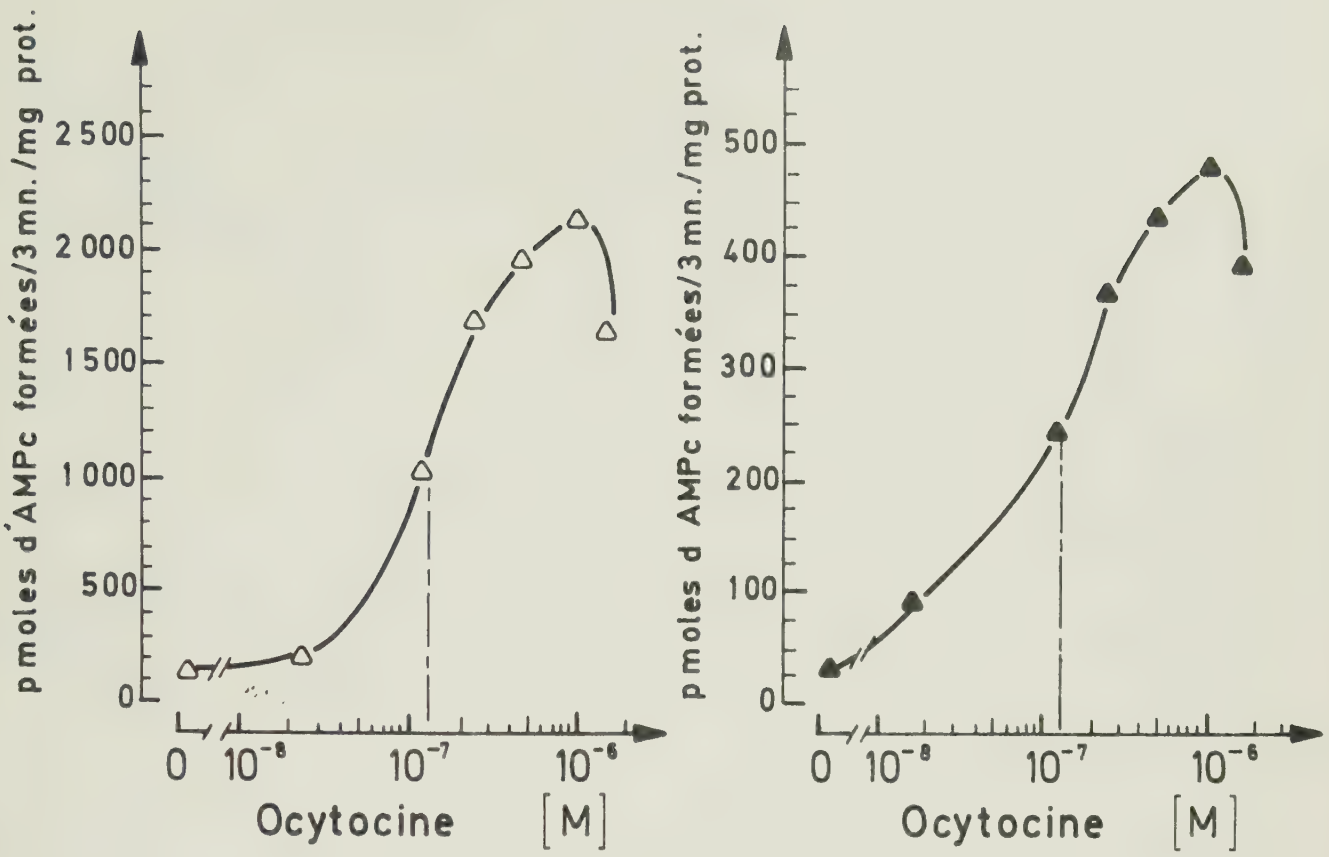


Figure 15 : INFLUENCE D'UN SYSTEME REGENERATEUR D'ATP SUR L'ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE PAR L'OCYTOCINE

Les incubations sont réalisées pendant 3 minutes en absence (▲) ou en présence (△) d'un système régénérateur d'ATP, composé de 20 mM de créatine phosphate et de 1 mg par ml de créatine kinase. La concentration de l'enzyme I est de 1,1 mg par ml, la température d'incubation de 37°C. Chaque point est la moyenne de deux valeurs expérimentales. La présence d'un système régénérateur d'ATP n'affecte pas l'affinité apparente de l'adényl cyclase pour l'hormone (traits verticaux discontinus). L'affinité apparente est la concentration d'hormone qui donne 50% de l'activation maximale.

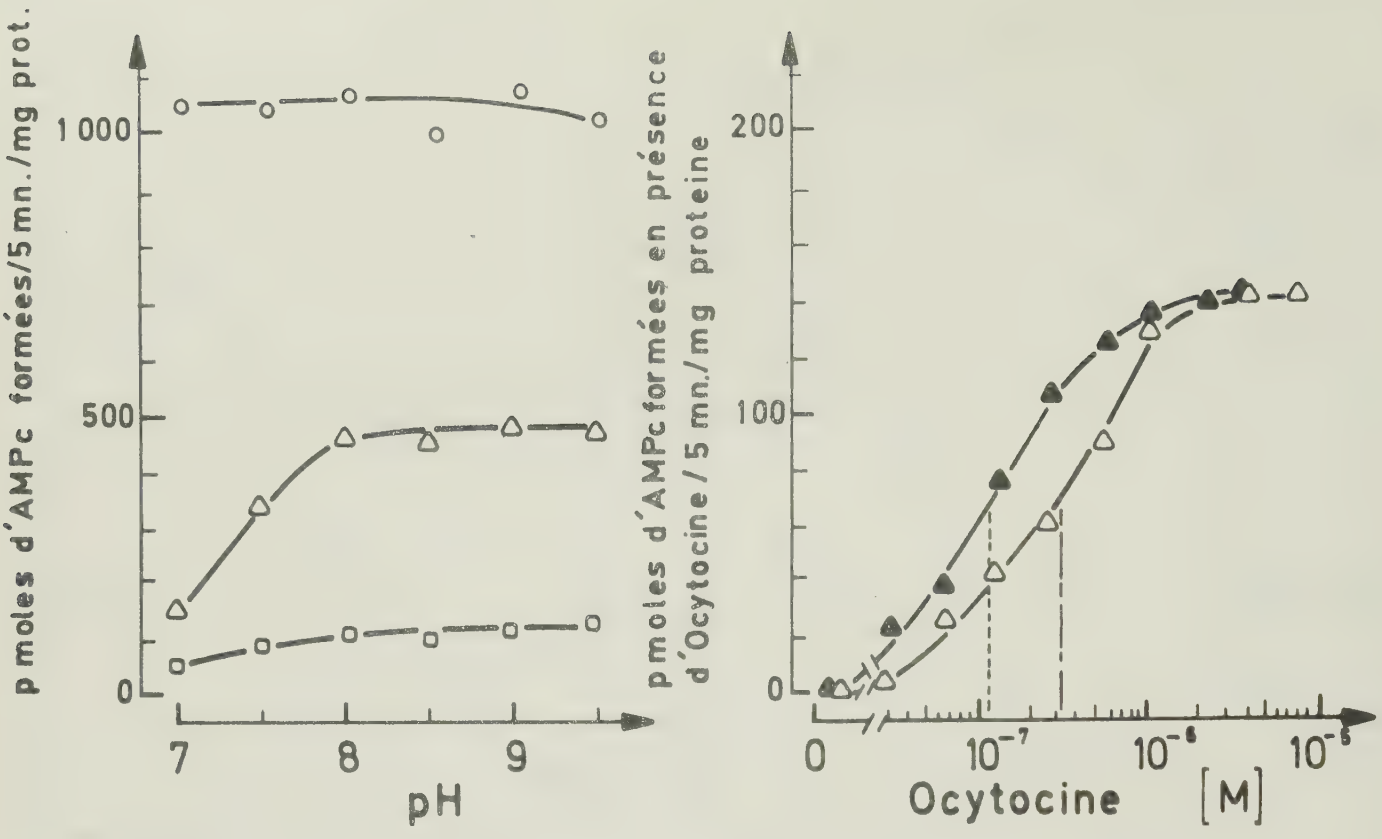


Figure 16 : EFFET DU pH SUR L'ADENYL CYCLASE DES "GHOSTS" DE CELLULES EPITHELIALES DE LA VESSIE DE GRENOUILLE

Partie de gauche: Les activités adényl-cyclasiques sont mesurées pendant 5 minutes en présence de fluorure (10^{-2}M) (o), d'ocytocine (2,0 X 10^{-7}M) (△) ou en absence d'agent stimulateur (□).
Le milieu d'incubation contient 100 mM de TRIS-HCl à différents pH, et 0,74 mg d'enzyme I par ml.

Partie de droite: Effet du pH sur l'affinité apparente de l'adényl cyclase pour l'ocytocine.

Les activités adényl-cyclasiques sont mesurées à deux pH pH 7 (△), et pH 8 (▲) en fonction de la concentration d'ocytocine. Aucun système régénérateur n'est ajouté, afin d'éviter les effets indirects possibles des ions $^{+}$H.

Les points sont la moyenne de deux valeurs expérimentales.
Seule l'affinité apparente (traits en pointillés) du système adényl-cyclasique pour l'ocytocine est affectée entre pH 7 et pH 8.

La quantité d'AMP cyclique formée en absence ou en présence d'une concentration maximale (10^{-6}M) d'ocytocine augmente linéairement en fonction du temps et de la concentration de protéine jusqu'à 100 µg de protéines dans 100 µl de milieu réactionnel (figure 14). L'addition d'une dose maximale d'hormone augmente de 5 à 15 fois l'activité cyclasique témoin. La concentration qui donne 50% de la réponse maximale est de 1,3 à 1,7 x 10^{-7}M (km cyclase = kmc) (figure 15). Pour les préparations les plus sensibles, des concentrations supramaximales d'ocytocine sont inhibitrices. La présence d'un système régénérateur d'ATP augmente beaucoup les activités cyclasiques mesurées en absence ou en présence d'ocytocine (figure 15). De plus, la présence de ce système limite l'accumulation d'ADP et d'AMP dans le milieu. Ces nucléotides inhibent la réaction cyclasique (91). Comme nous le montre la figure 16, le pH n'affecte pas de la même façon les activités cyclasiques témoins ou stimulées par l'ocytocine ou le fluorure. L'activité adényl-cyclasique témoin augmente légèrement entre pH 7,0 et pH 8,0, puis demeure inchangée jusqu'à pH 9,5. L'activité fluorure sensible est la même quelque soit le pH du milieu. Par contre, la stimulation par des concentrations sous-maximales d'ocytocine est accrue d'un facteur 3 entre pH 7,0 et pH 8,0, puis n'évolue plus jusqu'à 9,5. Cette baisse de l'activation entre pH 7 et pH 8 est essentiellement due à une diminution de l'affinité du système pour l'ocytocine (fig.16-partie de droite). Les activités adényl-cyclasiques ont donc été mesurées à pH 8.

L'activité adényl-cyclasique sensible à l'ocytocine a été mesurée en fonction de la concentration d'ATP et pour des concentrations croissantes de Mg^{++} (de 1 à 22 mM) (fig.17). La concentration d'EDTA, dans le milieu d'incubation est de 1,25mM. Comme le montre la figure 17, lorsque la concentration d'EDTA est supérieure à la concentration de Mg^{++}, l'activité adényl-cyclasique est pratiquement nulle. Lorsque la concentration de magnésium atteint 2mM, la vitesse de formation d'AMP cyclique augmente rapidement. L'augmentation ultérieure de la concentration de Mg^{++} conduit à un accroissement progressif de l'activité adényl-

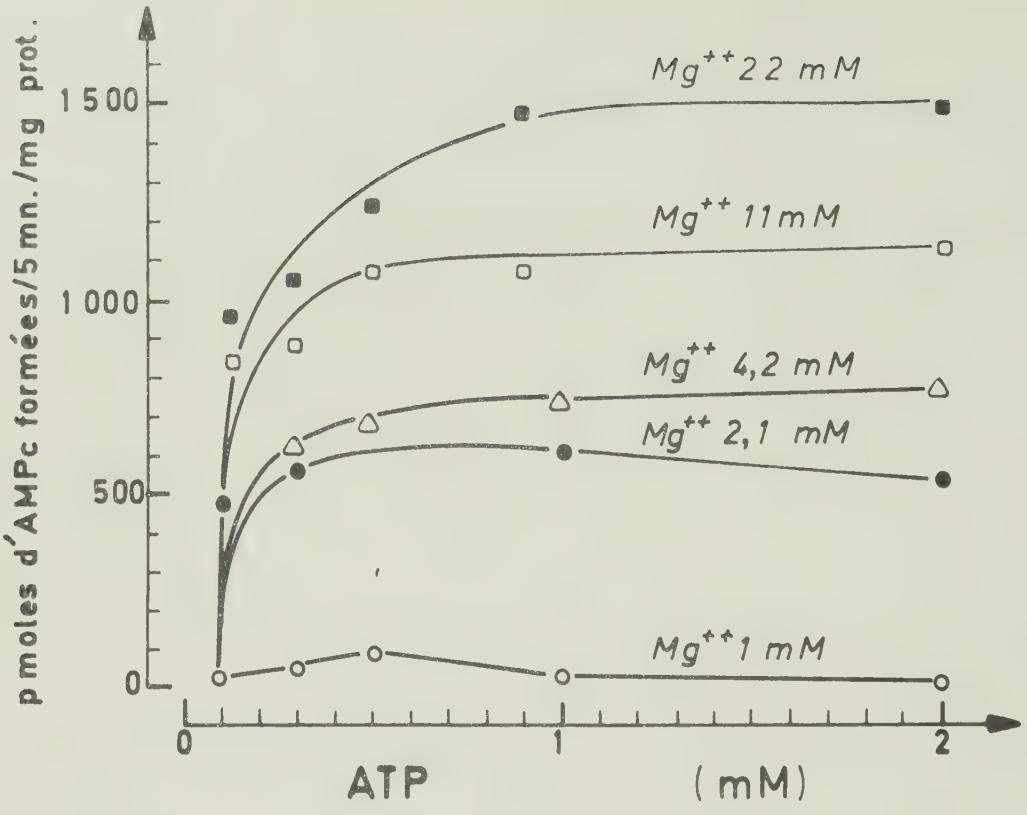


Figure 17 : EFFET DE L'ATP ET DU MAGNESIUM SUR L'ACTIVITE DE L'ADENYL CYCLASE STIMULEE PAR L'OCYTOCINE ($1,7 \times 10^{-7}$M)

Les incubations sont réalisées à 37°C en présence d'un système régénérateur d'ATP. La concentration de l'enzyme I est de 0,61 mg/ml.

cyclasique. Dans le domaine de concentrations étudié une saturation vis-à-vis du Mg^{++} n'est pas observée . La concentration de Mg^{++} choisie est de 10mM.

2) Corrélation entre la fixation d'ocytocine $[^3H]$ sur les "ghosts" de cellules épithéliales de la vessie de grenouille et l'activation de l'adényl-cyclase :

La fixation d'ocytocine $[^3H]$ sur les "ghosts" de cellules épithéliales de la vessie de grenouille est proportionnelle à la concentration d'enzyme dans le milieu. C'est aussi un phénomène limité dans le temps. Pour une concentration d'hormone marquée de $2,5 \times 10^{-7}$M, un équilibre est atteint après 10 minutes lorsque la température est de 30°c (figure 18). A 0°c et pour la même concentration hormonale, la valeur d'équilibre est la même, mais le temps nécessaire pour obtenir 50% de la fixation maximale est de 17 minutes. La fixation de l'hormone sur les "ghosts" est partiellement réversible (figure 18 - partie de droite) lorsqu'on abaisse la concentration hormonale de $2,5 \times 10^{-7}$M à $1,25 \times 10^{-8}$M, concentration pour laquelle il n'y a plus d'activation de l'adényl-cyclase. Dans ces conditions 60% environ de la radioactivité est libérée. Si l'on ajoute dans le milieu de dilution du dithiothreitol, agent réducteur des ponts disulfures, la réversibilité est complète.

Une mesure simultanée de la fixation d'ocytocine $[^3H]$ et de l'activation de l'adényl cyclase en fonction de la concentration d'hormone marquée dans le milieu, montre que la fixation, comme l'activation adényl-cyclasique sont détectables pour la même concentration d'hormone dans le milieu : $2\text{-}5 \times 10^{-8}$M (figure 19). La saturation de la fixation est atteinte lorsque la concentration d'hormone est de 10^{-6}M. C'est également pour cette concentration que l'on obtient une stimulation maximale de l'adényl-cyclase. L'affinité apparente des sites de fixation pour l'hormone est de 5×10^{-7}M (km_1). Elle est légèrement supérieure à l'affinité du système adényl-cyclasique pour l'hormone (concentration d'hormone qui donne 50% de l'activation maximale = $3\text{-}4 \times 10^{-7}$M).

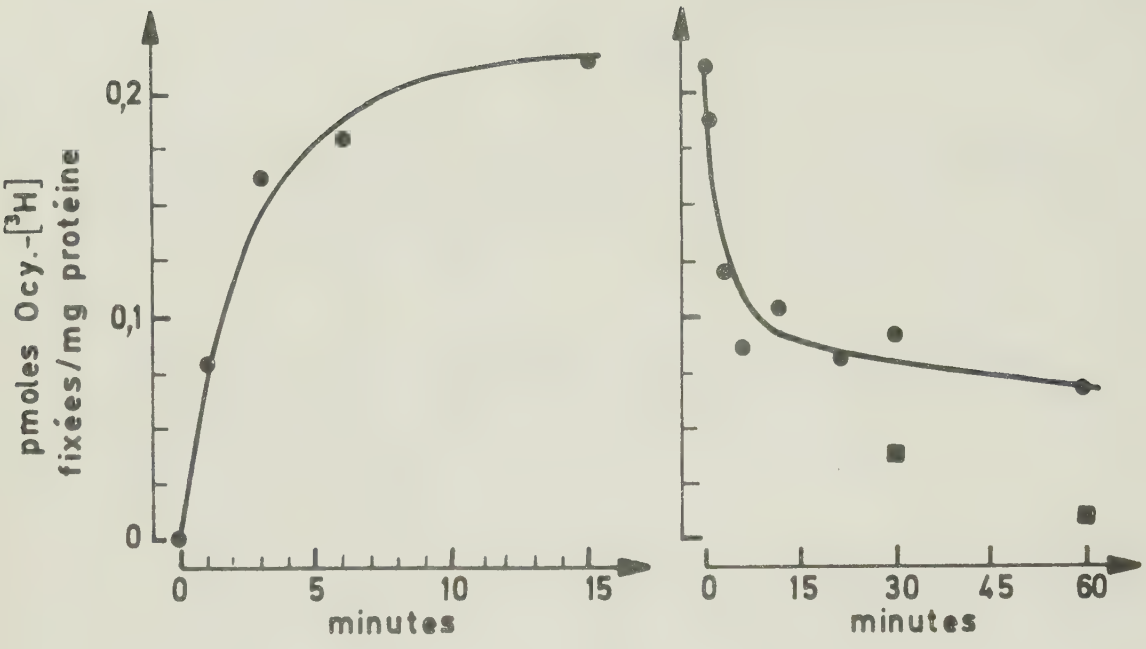


Figure 18 : CINETIQUE D'ASSOCIATION DE L'OCYTOCINE[^{3}H] AVEC LES "GHOSTS" DE CELLULES EPITHELIALES DE LA VESSIE DES AMPHIBIENS (partie de gauche). REVERSIBILITE DE LA LIAISON (partie de droite)

L'enzyme I (0,92 mg/ml) est incubé dans 100 µl en présence d'ocytocine ^{3}H (2,5 X 10^{-7}M). La liaison de l'hormone avec les "ghosts" est mesurée par la technique de filtration sur Millipore (voir "Méthodes"). Pour mesurer la réversibilité de la fixation, l'enzyme est incubée pendant 15 minutes à 30°C en présence de 2,5 X 10^{-7}M d'ocytocine [^{3}H]. La concentration hormonale est alors abaissée à 1,25 X 10^{-8}M en diluant le milieu d'incubation avec une solution (2 ml) ne contenant pas d'hormone (solution A, voir "Méthodes"). La liaison résiduelle est mesurée en fonction du temps qui suit la dilution (partie de droite). Pour certains échantillons, la solution A contient 10^{-2}M de dithiothreitol (■).

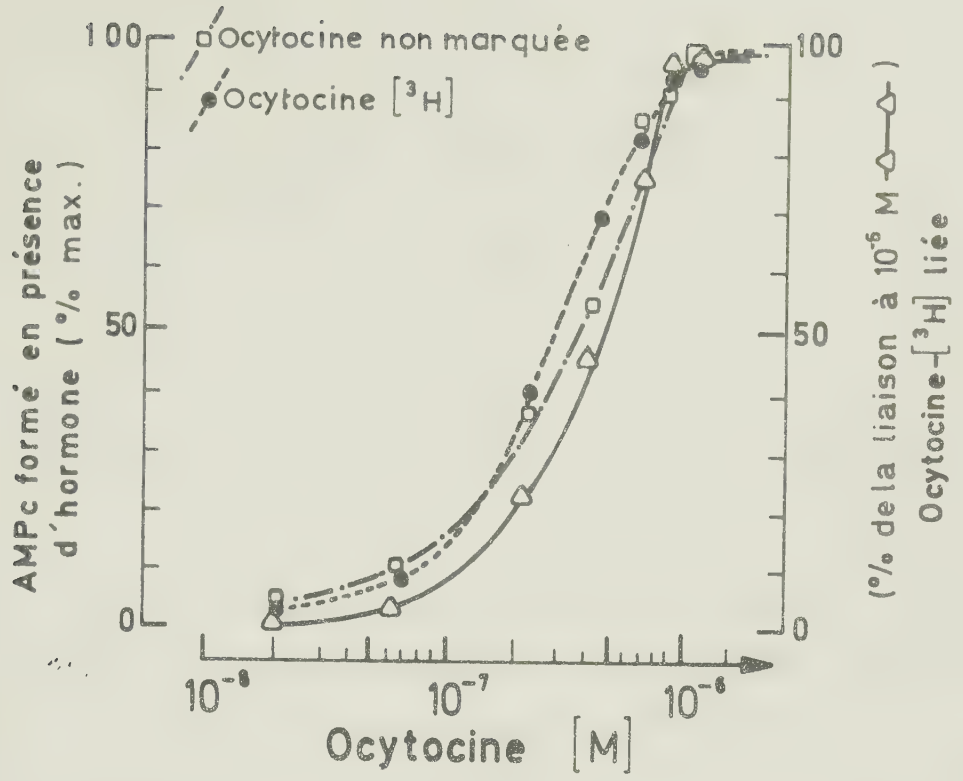


Figure 19 : CORRELATION ENTRE LA FIXATION D'OCYTOCINE $[^3H]$ SUR LES "GHOSTS" DE CELLULES EPITHELIALES ET L'ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE

La fixation de l'ocytocine $[^3H]$ est mesurée après 5 minutes d'incubation à 30°C et exprimée en % de la capacité maximale des sites à haute affinité (égale à 0,53 pmole d'ocytocine $[^3H]$ fixée par mg de protéïne).

Les activités cyclasiques mesurées en présence d'hormone pendant 5 minutes à 30°C sont exprimées en % de l'activité maximale (égale à 637 pmoles d'AMPc formées/5 minutes/mg de protéïne). L'activité adényl-cyclasique du témoin est de 140 pmoles d'AMPc formées/5 minutes/mg de protéine. La concentration d'enzyme I est de 0,98 mg/ml.

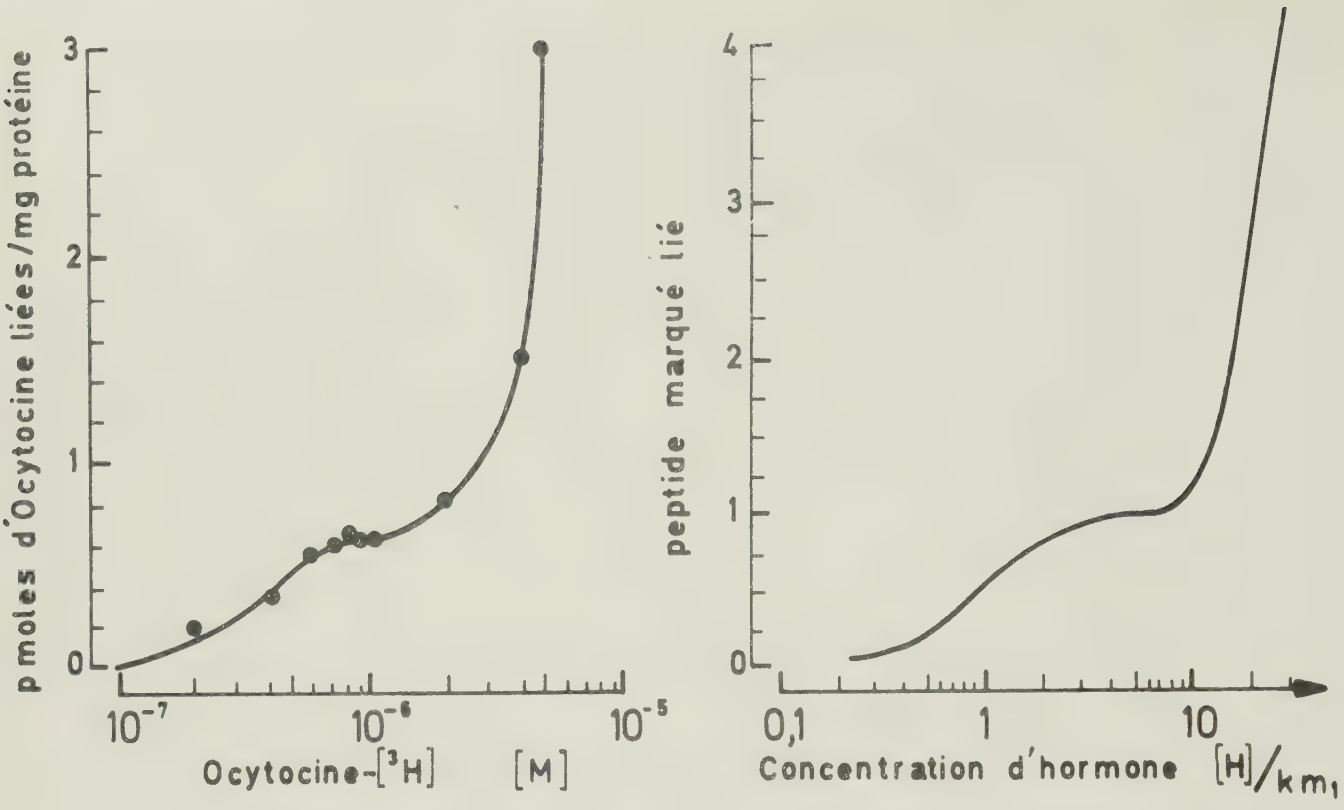


Figure 20 : FIXATION DE L'OCYTOCINE [^{3}H] SUR LES "GHOSTS DE CELLULES EPITHELIALES DE LA VESSIE DE GRENOUILLE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION HORMONALE

La liaison hormone-récepteur est mesurée après 5 minutes d'incubation à 30°C. La concentration de l'enzyme I est de 1,08 mg/ml. Notez la présence d'un plateau de saturation entre 7,0 et 15 X 10^{-7}M, sur la courbe expérimentale (partie de gauche). Cette courbe peut être décrite si l'on admet l'existence d'une liaison coopérative sur deux catégories de sites (1 et 2) avec des affinités (km_1 et km_2) et des capacités maximales (R_{T1} et R_{T2}) différentes. La somme des fixations sur ces deux catégories de sites est donnée par l'équation:

$$RH = RT_1 \frac{H^{n_1}}{(km_1)^{n_1} + H^{n_1}} + RT_2 \frac{H^{n_2}}{(km_2)^{n_2} + H^{n_2}}$$

La courbe théorique (partie de droite) est construite en utilisant les paramètres suivants: $km_2/km_1 = 40$, $R_{T_2}/R_{T_1} = 30$, $n_1 = 2$, $n_2 = 4$. H varie entre 0,1 et 30 km_1

Lorsque la concentration d'ocytocine $[^3H]$ dans le milieu d'incubation est augmentée au-delà des valeurs donnant une activation maximale de l'adényl-cyclase et correspondant à une saturation apparente des sites récepteurs, une fixation complémentaire de peptide tritié apparaît ; elle augmente rapidement à partir d'une concentration de 10^{-6}M. Cette observation suggère la présence sur les "ghosts" de cellules épithéliales, d'une deuxième catégorie de sites de faible affinité pour l'hormone (figure 20). La concentration d'hormone marquée n'étant pas suffisamment élevée, la saturation des sites de plus faible affinité n'a pu être mise en évidence directement. L'inhibition de la fixation d'ocytocine $[^3H]$ observée lorsque des quantités croissantes d'hormone non marquée sont ajoutées au milieu d'incubation (figure 21) montre très clairement que ces sites de fixation ont une capacité limitée. L'affinité "apparente" est mesurée par la concentration d'hormone qui assure une saturation de 50% de sites. Les valeurs calculées sont respectivement $km_1 = 2,5 \times 10^{-7}$M pour les sites à haute affinité et $km_2 = 10^{-5}$M pour les sites à faible affinité. Les capacités de fixation correspondantes sont respectivement $RT_1 = 0,6$ p moles/mg de protéine et $RT_2 = 18$ p moles/mg de protéine. Les sites à faible affinité sont donc 30 fois plus abondants que les sites à haute affinité ; le rapport des affinités respectives pour l'hormone de ces deux catégories de sites est de 40. La liaison de l'ocytocine $[^3H]$ sur les deux catégories de sites a été analysée en supposant que la fixation se fait indépendamment sur l'une ou l'autre.

Dans le système de coordonnées de Hill (92), une corrélation linéaire satisfaisante est observée entre $\log[H]$ et $\log [RH]/[RT] - [RH]$ ($[H]$ = concentration de l'hormone dans le milieu, $[RH]$ = concentration du complexe hormone récepteur et $[RT]$ = concentration totale du récepteur) et ceci pour les deux catégories de récepteurs mises en évidence. Les pentes des droites de regression linéaire obtenues sont respectivement $n_1 = 1,5$ pour les sites à haute affinité, et $n_2 = 4$ pour les sites à faible affinité. Selon Koshland (93), on peut donc décrire l'évolution de la concentration du complexe RH en fonction de la concentration d'hormone par la réaction suivante :

$$[RH] = [RT_1] \times \frac{[H]^{n1}}{[km_1]^{n1} + [H]^{n1}} + [RT_2] \times \frac{[H]^{n2}}{[km_2]^{n2} + [H]^{n2}} \quad (1)$$

(les indices 1 et 2 se réfèrent respectivement aux sites de haute et de faible affinité, $[RH]$ représente la somme des concentrations des complexes $[RH_1]$ et $[RH_2]$ formés avec les 2 catégories de site 1 et 2.)

La courbe théorique calculée à partir de la relation précédente et en utilisant les valeurs de $[RT_1]$, $[RT_2]$, km_1, km_2, 1 et 2 déterminées expérimentalement (figure 20, partie de droite) rend effectivement compte de la courbe expérimentale (figure 20, partie de gauche).

S p é c i f i c i t é des s i t e s de f i x a t i o n

L'adényl cyclase des cellules épithéliales de vessie est capable de discriminer entre des peptides de structure voisine. Son affinité pour la lysine vasopressine ($km = 10^{-5}M$) est 50 fois plus faible que son affinité pour l'ocytocine (figure 22, partie supérieure). L'affinité "apparente" de l'ocytocine pour son récepteur est diminuée en présence de lysine-vasopressine (figure 22, partie inférieure). L'inhibition est de type purement compétitif.

L'ocytocine et la lysine-vasopressine non marquées inhibent la fixation d'ocytocine $[^3H]$ sur les deux catégories de sites (figure 21, partie de gauche). A concentration égale, l'ocytocine inhibe davantage la fixation d'hormone marquée que ne le fait la lysine-vasopressine. Pour une concentration d'hormone tritiée constante et inférieure au km_1, les courbes de déplacement par l'ocytocine et la lysine-vasopressine non marquées sont bimodales comme le prévoit l'équation (1) (figure 21, partie de droite). L'augmentation initiale de la fixation traduit le caractère coopératif de la fixation de l'hormone sur les sites à haute affinité, la saturation progressive de ces sites rend compte de l'inhibition ultérieure de la fixation d'ocytocine $[^3H]$. Le deuxième

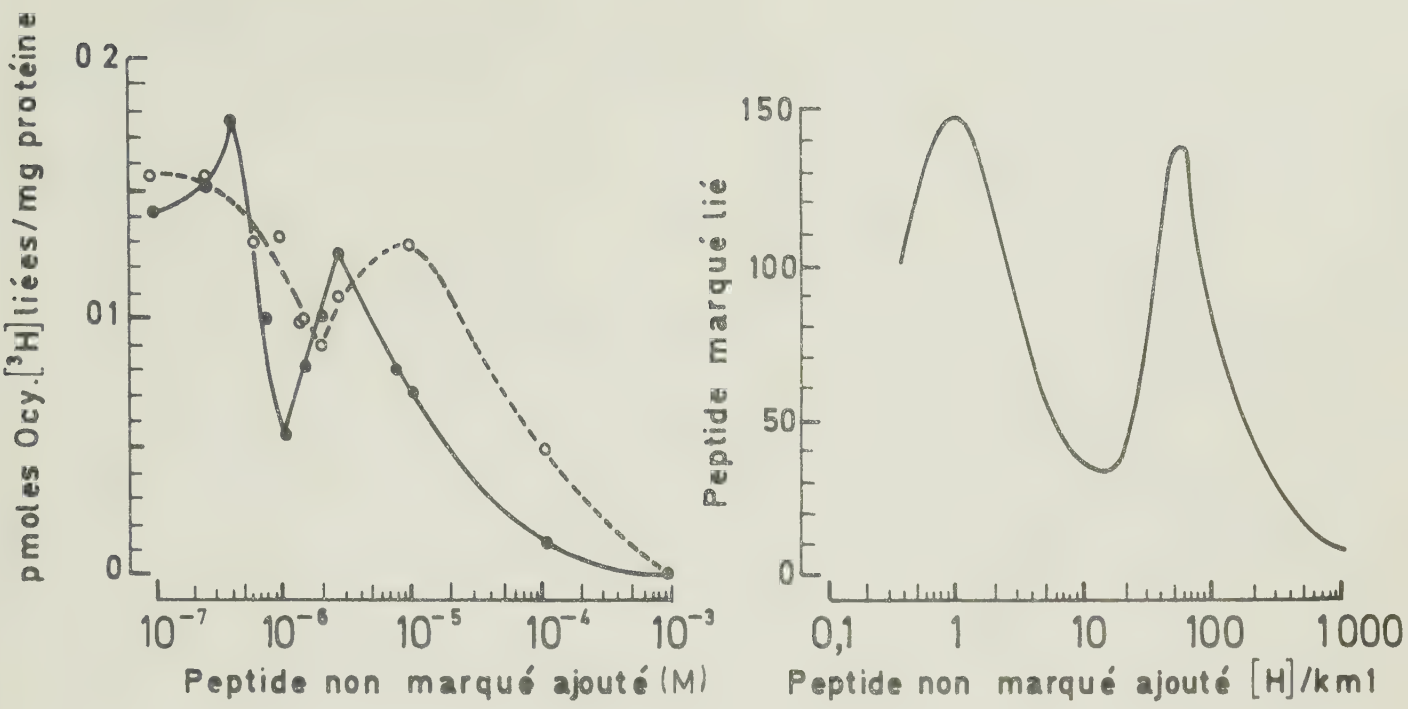


Figure 21 : COMPETITION ENTRE L'OCYTOCINE $[^3H]$ ET L'OCYTOCINE NON MARQUEE (•) D'UNE PART, ET ENTRE L'OCYTOCINE ^3H ET LA LYSINE-VASOPRESSINE D'AUTRE PART (○)

La liaison est mesurée après 5 minutes d'incubation à 30°C. La concentration de l'enzyme est de 0,96 mg/ml. Chaque tube contient de l'ocytocine $[^3H]$ et des concentrations croissantes (0 à 10^{-3}M) d'ocytocine (ocy.) ou de lysine-vasopressine (L.V.P.) non marquées. Toutes les valeurs expérimentales sont corrigées pour la liaison non spécifique. Nous la considérons comme égale à la fixation résiduelle mesurée en présence de 10^{-3}M d'ocytocine non marquée (elle représente 24% de la liaison totale à 10^{-7}M).

La courbe théorique (partie de droite) est calculée à partir du modèle proposé dans la légende de la figure 20 La concentration d'ocytocine $[^3H]$ correspond à 0,2 km_1 , la liaison est exprimée en % de la liaison mesurée en présence d'ocytocine $[^3H]$ seule.

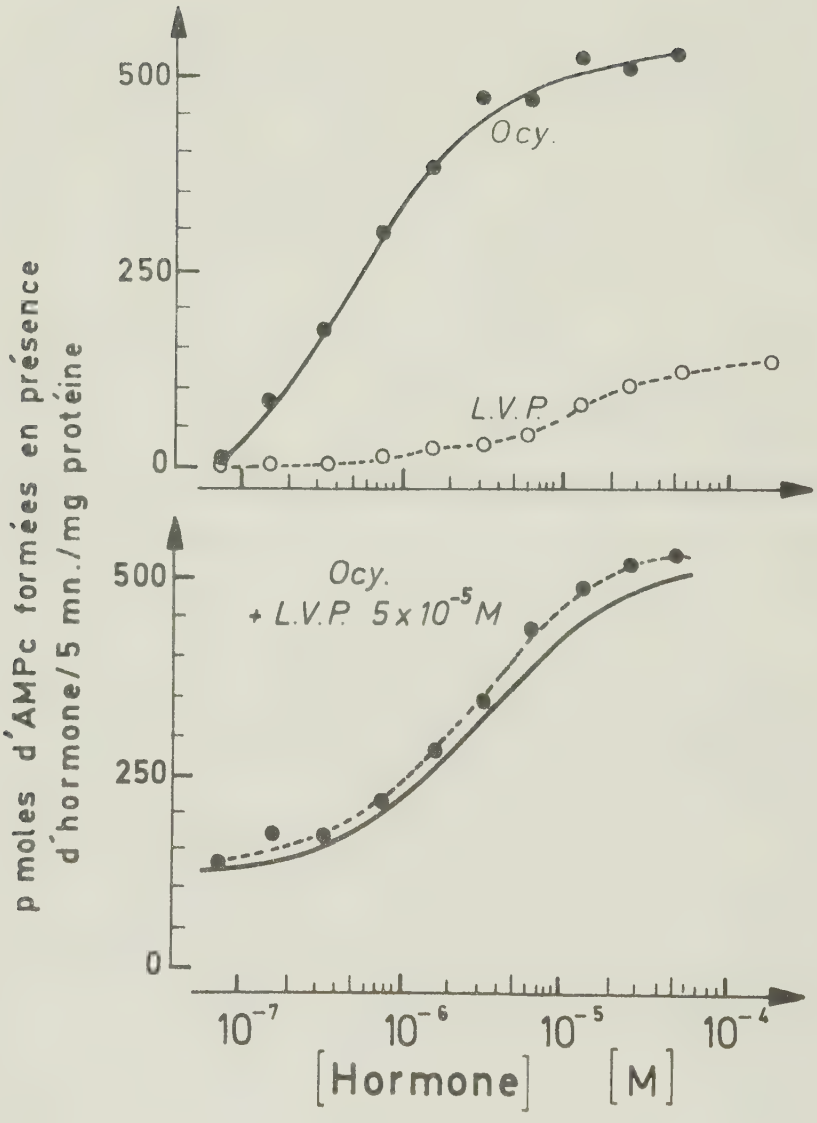


Figure 22 : ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE DES "GHOSTS" DE CELLULES EPITHELIALES DE LA VESSIE DE GRENOUILLE PAR L'OCYTOCINE ET LA LYSINE-VASOPRESSINE

L'activation de l'adényl cyclase est mesurée pendant 5 minutes et à 30°C en présence:

1) de concentrations croissantes d'ocytocine (ocy.) ou de lysine-vasopressine (L.V.P.) (partie supérieure de la figure);

2) d'une quantité constante de lysine-vasopressine (5 X 10^{-5}M) plus des concentrations croissantes d'ocytocine (partie inférieure de la figure, traits en pointillés). L'activation de l'adényl cyclase due à l'hormone est portée en fonction de la quantité de peptide dans le milieu.

La courbe en trait plein de la partie inférieure de la figure est construite en supposant que les deux hormones se fixent sur les mêmes récepteurs, et en utilisant les valeurs des km et des vitesses maximales déduites des courbes de la partie supérieure de la figure.

pic observé traduit une fixation coopérative sur les sites de faible affinité suivie de leur saturation progressive.

D) DISCUSSION

Nos résultats confirment l'existence dans les cellules épithéliales de la vessie des amphibiens d'une adényl cyclase stimulable par les peptides neurohypophysaires. Lorsque le Mg^{++} est complexé par l'EDTA, la réaction adényl-cyclasique est très faible malgré la présence d'ATP. La présence de Mg^{++} libre est indispensable à l'activité de l'enzyme. Cette observation suggère que le substrat de la réaction pourrait être l'ATP-Mg^{++}, comme d'autres auteurs l'ont déjà proposé (94-95-96). La vitesse de la réaction augmente ensuite plus progressivement lorsque la concentration de Mg^{++} est accrue. Un rôle possible du Mg^{++} dans la stabilisation des membranes (donc de l'adényl-cyclase) a été suggéré (94-95) pour expliquer cet effet du Mg^{++} très général dans les systèmes adényl-cyclasiques.

L'acidification de la solution baignant la face interne de la vessie de crapaud maintenue en survie <u>in vitro</u> inhibe l'augmentation du flux osmotique d'eau produit par les hormones neurohypophysaires (97-98-99). L'inhibition a les caractères d'une inhibition compétitive entre pH 8,0 et pH 7,0, et non compétitive pour des pH inférieurs (99). Sur la base de ces résultats, il a été suggéré que les protons exercent une double action sur le système, inhibition compétitive de la fixation de l'hormone sur son récepteur et inhibition d'une étape postérieure à l'intéraction. Les résultats de l'étude directe de l'effet du pH sur l'activité adényl-cyclasique sont compatibles avec une telle interprétation. En effet, l'inhibition observée entre pH 8 et pH 7 est principalement le résultat d'une diminution de l'affinité apparente du système adényl-cyclasique pour l'hormone, sans modification apparente de l'activation maximale.

En utilisant de l'ocytocine $[^3H]$ de très forte radioactivité

spécifique, il est possible de mettre en évidence des sites de fixation vraisemblablement assimilables aux récepteurs impliqués dans l'activation de l'adényl-cyclase. La fixation se produit à partir de 5×10^{-8}M, concentration minimale d'hormone qui stimule l'adényl-cyclase. La saturation de ces sites est obtenue pour une concentration d'hormone qui assure l'activation maximale de l'adényl-cyclase (10^{-6}M). L'affinité "apparente" des sites de fixation (5×10^{-7}M) est très voisine de l'affinité "apparente" déterminée à partir de l'activation adényl-cyclasique ($3\text{-}4 \times 10^{-7}$M). Enfin, la lysine-vasopressine non marquée moins active que l'ocytocine sur ce système a également moins d'affinité que cette dernière pour les sites de fixation détectés.

Comme les cellules de l'épithélium isolé, les "ghosts" de cellules épithéliales contiennent deux catégories de récepteurs différents par leurs affinités pour l'hormone et leurs capacités de fixation. Seuls les sites d'affinité élevée semble être impliqués dans l'activation de l'adényl cyclase. La fixation totale mesurée peut être décrite comme la somme des fixations sur deux catégories de sites indépendants. La courbe de saturation des sites responsables de l'activation cyclasique est sigmoïde (coefficient de Hill : 1,5). Par analogie avec les propriétés des enzymes polymériques, on pourrait supposer que la fixation d'une molécule hormonale sur un de ses sites de fixation est favorisée par l'occupation des sites voisins. Il est intéressant de constater qu'une relation sigmoïde entre l'amplitude de la réponse biologique du système intact et la concentration d'hormone a été décrite par Jard et al (31). La fixation sur la deuxième catégorie de sites à plus faible affinité est très coopérative, puisque le n de Hill est égal à 4.

Comme sur l'épithélium isolé, une partie (40% environ) de l'hormone liée aux "ghosts" de cellules de vessie est vraisemblablement fixée par l'intermédiaire de ponts disulfures mixtes entre l'hormone et des groupes SH libres de la structure (elle n'est en effet déplaçable qu'en présence de dithiothreitol).

Il existe donc de grandes analogies entre les caractéristiques de la fixation de l'ocytocine tritiée sur l'assise épithéliale intacte de la peau et le système acellulaire représenté par les "ghosts" de cellules épithéliales de vessie : 1) Présence de deux catégories de sites différents par leurs affinités et leurs capacités de fixation. 2) Seuls les sites d'affinité élevée semblent impliqués dans le déclenchement des réponses biologiques mesurées (stimulation du transport actif de sodium ou activation de l'adényl cyclase membranaire. 3) Caractère très coopératif de la fixation sur les sites à faible affinité. 4) Existence d'une fixation covalente par l'intermédiaire de ponts disulfures. Une différence très importante existe cependant entre le système intact et le système acellulaire ; l'affinité "apparente" des sites de fixation pour l'hormone est beaucoup plus faible dans le système acellulaire que dans le système intact. Il est très difficile d'admettre que les sites de fixation détectés dans l'un et l'autre cas soient de nature entièrement différente . Il est plus vraisemblable que la différence observée traduise une perte d'affinité des sites récepteurs au cours de la préparation des "ghosts". Cette perte d'affinité est du même ordre de grandeur pour les deux catégories de sites ; elle est compatible avec le maintien de leur pouvoir de discrimination entre des molécules de structure voisine. Elle pourrait résulter d'une dénaturation mécanique ou chimique au cours de l'homogénéisation. Une destruction rapide de l'hormone dans le milieu d'incubation pourrait également conduire à une sous estimation de l'affinité apparente des sites de fixation. La présence d'enzymes de dégradation des peptides neurohypophysaires dans les fractions microsomales (100) et solubles (37) d'homogénats de vessie de crapaud a été décrite. Il n'est pas exclu que l'homogénéisation démasque des enzymes d'inactivation ou que l'environnement ionique (Mg^{++} par exemple) augmente leurs activités. Le contrôle rigoureux de la dégradation de l'hormone est une des conditions indispensables à l'étude précise de l'intéraction hormone-récepteur aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* comme le montrent par exemple des études récentes de

l'adényl-cyclase hépatique sensible au glucagon. La dégradation du glucagon par les membranes de foie est très importante (38-101). Illiano et Cuatrecasas ont montré que cette dégradation pouvait être inhibée par la bacitracine (102). Dans les conditions normales, la stimulation de l'adényl cyclase est apparente à 10^{-9}M d'hormone. En présence de bacitracine, une concentration de glucagon de 10^{-10}M suf-fit pour obtenir une stimulation de l'adényl cyclase d'un facteur 3. Dans le cas des hormones neurohypophysaires, la présence d'un inhibiteur de la réponse hydrosmotique ou utérotonique a été décrite dans des homogénats de vessie de crapaud (103-104). Cet inhibiteur n'est dialysable que lorsque l'homogénat est préalablement traité pendant 10 minutes à 100°c. Les auteurs pensent que la chaleur peut assurer la libération de l'inhibiteur absorbé sur les protéines. On ignore à quelle étape du mécanisme d'action cet inhibiteur agit. La présence d'un tel produit dans nos préparations de "ghosts" ne peut être exclue. La lysine vasopressine et l'ocytocine ne produisent pas la même stimulation maximale de l'adényl cyclase (voir figure 22). Ces deux analogues sont pourtant capables de produire une stimulation maximale du flux osmotique d'eau sur la vessie des amphibiens. Cette observation suggère que la réponse hydrosmotique maximale de la structure intacte par l'ocytocine peut être obtenue par une saturation partielle des sites. Il existerait donc dans ce cas des "récepteurs de réserve". Sur la base d'arguments pharmacologiques, Eggena et al (34) ont formulé la même hypothèse. L'existence de ces récepteurs de réserve rend encore plus difficile la comparaison entre les affinités "apparentes", mesurées sur le système in-vivo à partir des courbes dose-réponse biologique, et mesurées in-vitro à partir de la concentration hormonale qui donne 50 % de la stimulation cyclasique maximale. Il faudrait admettre que la réponse hydrosmotique maximale puisse être obtenue pour une stimulation de 25% de l'adényl-cyclase totale (voir figure 22).

CHAPITRE TROISIEME

IDENTIFICATION DU RECEPTEUR MOLECULAIRE DE LA LYSINE-VASOPRESSINE DES MEMBRANES PLASMIQUES DE MEDULLA DE REIN DE PORC

L'utilisation des cellules épithéliales de la vessie de grenouille pour l'étude ultérieure de l'intéraction hormone-récepteur présente deux difficultés essentielles inhérentes au choix de ce matériel biologique. D'une part, il est difficile de préparer en quantités suffisantes des fractions subcellulaires enrichies en membranes plasmiques, d'autre part, la présence sur cette structure de deux catégories de sites de fixation dont une seule peut être assimilée aux récepteurs physiologiques, complique l'interprétation des résultats. C'est pourquoi nous avons poursuivi notre étude sur le rein des mammifères en utilisant de la lysine-vasopressine tritiée (voir méthodes). La lysine-vasopressine, hormone naturelle du porc, de l'hippopotame et du peccary (105-106), a été choisie comme hormone effectrice car elle est plus stable que l'arginine-vasopressine. Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent que l'on peut préparer des membranes plasmiques de rein de porc partiellement purifiées contenant une adényl cyclase stimulable 4 à 6 fois par la lysine-vasopressine. Aucune enzyme de dégradation de l'hormone n'est présente dans cette préparation membranaire. Cette importante caractéristique, ainsi que la présence d'une seule catégorie de récepteurs spécifiques de la lysine-vasopressine, nous ont permis d'étudier avec précision les caractéristiques cinétiques de l'intéraction hormone-récepteur.

A) CARACTERISTIQUES ENZYMATIQUES DES MEMBRANES PLASMIQUES

1) Membranes plasmiques purifiées

La technique de Emmelot et al (54) appliquée à la préparation des membranes plasmiques du rein (voir méthodes), permet d'obtenir un maté-

riel purifié. Le tableau n° 6 montre que les activités spécifiques des enzymes liées aux membranes comme l'adényl cyclase stimulée ou non par le fluorure, l'ATPase Na^+, K^+ dépendante (mesurée selon la technique de Post et Sen (107)), sont augmentées cinq fois par rapport à l'homogénat de départ. L'activité spécifique de la succinate cytochrome C réductase, enzyme "marqueur" des mitochondries (mesurée selon la technique de Fleisher et Fleisher (108)) est réduite quatre fois. L'activité spécifique de la NADPH cytochrome C réductase enzyme "marqueur" des microsomes, n'est réduite que 1,6 fois. Elle a été mesurée selon la technique de Fleisher et Fleisher (108). L'adényl cyclase est activable par la lysine-vasopressine mais au cours de la purification des membranes, le facteur de stimulation décroît.

Un des paramètres critiques pour la préservation de l'activation de l'adényl cyclase par l'hormone est la présence de sucrose isotonique dans le milieu d'homogénéisation. Comme le montre la figure 23, la stimulation de l'adénylcyclase est plus importante (affinité apparente pour l'hormone plus élevée et vitesse maximale augmentée) lorsque l'homogénéisation est réalisée en présence de sucrose isotonique. Aussi, avons-nous modifié la technique de Emmelot et al (54), dans laquelle l'homogénéisation est faite en milieu hypotonique (1mM HCO_3Na).

2) Membranes plasmiques partiellement purifiées.

Le lavage intensif en milieu hypotonique du culot 300g d'un homogénat initial obtenu par homogénéisation en milieu isotonique, permet d'accroître le facteur de stimulation de l'adényl-cyclase par la L.V.P. (tableau 7). Ce résultat est dû à une élimination progressive de l'adényl-cyclase insensible à la L.V.P. L'activation obtenue pour de fortes concentrations hormonales est la même que l'activation produite par 10^{-2}M de fluorure. On considère généralement que cet ion produit une activation totale de l'adényl cyclase. L'activité spécifique de l'ATPase Na^+, K^+ dépendante n'augmente pas au cours de la préparation, toutefois, le rapport activité ATPasique (Na^+/K^+) / activité ATPasique (Mg^{++}) dépendante, s'accroît de 0,13 à 0,53 suggérant une élimination

TABLEAU N° 6 CARACTERISTIQUES DES MEMBRANES PLASMIQUES PREPAREES SELON LA METHODE DE EMMELOT ET AL. (54)

Les activités spécifiques des enzymes sont exprimées en p moles de substrat transformées par mg de protéine et par heure, à l'exception des activités adényl-cyclasiques exprimées en p moles AMPcyclique formées par mg de protéine et pour 5minutes .

FRACTION	Adényl-cyclase			Na^+, K^+, ATPase	$\frac{Na^+, K^+}{Mg^{++}}$, ATPase	Succinate cytochrome C réductase	NADPH cytochrome C réductase
	Témoin	L.V.P. (10^{-7}M)	NaF (10^{-2}M)				
Homogénat	20,2	35,0	103,3	1,97	0,25	0,90	0,80
Membranes purifiées	100,8	132,0	617,0	9,81	0,50	0,20	0,41
$\frac{\text{Homogénat}}{\text{Membranes purifiées}}$	5,3	3,8	6,0	5,0	2,0	0,22	0,50

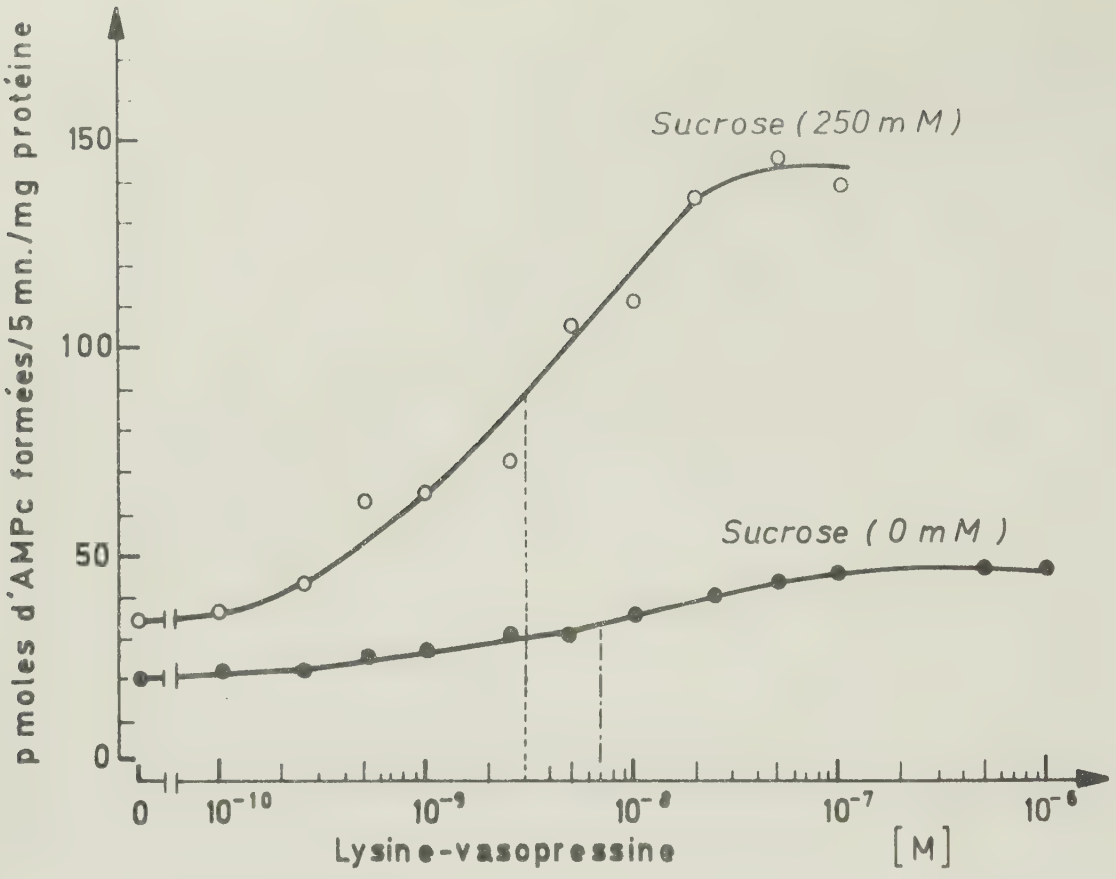


Figure 23 : INFLUENCE DU MILIEU D'HOMOGENEISATION SUR L'ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE DE MEDULLAIRE DE REIN PAR LA LYSINE-VASOPRESSINE

Deux préparations membranaires sont comparées: l'une est obtenue après homogénéisation en milieu isotonique (250 mM de sucrose) comme nous l'avons décrit dans le chapitre "Méthodologie" (-o-o-). L'autre est obtenue après homogénéisation dans le même milieu mais sans sucrose (-●-●-). Les incubations sont faites à 30°C pendant 5 minutes. Les concentrations de protéines sont respectivement de 1,73 mg/ml (o) et de 1,69 mg/ml (●).

de l'ATPase mitochondriale Mg^{++} dépendante. La purification ultérieure des membranes sur gradient de flottaison n'améliore pas l'activité spécifique de l'adényl cyclase, ni la stimulation hormonale. Ce sont les membranes partiellement purifiées que nous avons utilisées. Nous avons mesuré au cours de leur préparation l'évolution de la fixation de la L.V.P. $[^3H]$. La concentration d'hormone marquée utilisée est de 10^{-8}M. A cette concentration d'hormone marquée, la présence de L.V.P. non marquée (concentration de 10^{-8}M) inhibe de 25% la fixation. En présence de 10^{-7}M de L.V.P. non marquée l'inhibition obtenue est de 85%. Les concentrations d'hormone non marquée, supérieures à 10^{-7}M n'accroissent pas le pourcentage d'inhibition. La signification de la radioactivité résiduelle que nous appèllerons "non spécifique" n'apparaît pas univoque. Elle peut refléter une liaison de l'hormone marquée avec des sites de basse affinité , mais de capacité très importante. Ou bien, elle peut être la conséquence d'une adsorption non spécifique de l'hormone au système particulaire. Cette hypothèse est la plus vraisemblable, car cette fixation non spécifique (mesurée de façon systématique en présence de 10^{-5}M de L.V.P. non marquée) atteint une valeur submaximale presque instantanément en moins de 30 secondes, puis augmente très lentement. La fixation non spécifique mesurée après 1 minute est égale à 80% de la fixation non spécifique mesurée après 4 heures d'incubation. Pour un temps d'incubation donné, la fixation non spécifique est la même à 0°c ou à 30°c. Pour toutes les expériences de liaison de l'hormone marquée avec ses récepteurs les points expérimentaux sont faits en double, un troisième point sert à déterminer la fixation non-spécifique. La fixation spécifique est alors déterminée par différence entre la fixation totale et la fixation non spécifique. La purification permet de réduire beaucoup la composante non spécifique. Le rapport entre la fixation spécifique et la fixation non spécifique est égal à 1 dans l'homogénat, et à 6 dans les membranes partiellement purifiées que nous avons utilisées. La présence d'enzymes de dégradation des hormones polypeptidiques a été mise en évidence sur les membranes

TABLEAU N° 7 CARACTERISTIQUES ENZYMATIQUES DES MEMBRANES PLASMIQUES PREPAREES EN MILIEU ISOTONIQUE . EVOLUTION DE LA FIXATION SPECIFIQUE DE L.V.P. [^{3}H].

Les activités spécifiques des enzymes sont exprimées en micromoles de substrat transformées par mg de protéine et par heure,à l'exception des activités adényl-cyclasiques exprimées en p moles d'AMP cyclique formées par mg de protéine et pour 5minutes.La liaison de L.V.P. [^{3}H]est exprimée en p moles d'hormone marquée fixées par mg de protéine .

FRACTION	Adényl cyclase			Liaison de L.V.P. [^{3}H] (10^{-8} M)		Na^+, K^+, ATPase	Na^+, K^+, Mg^{++} ATPase	Succinate cytochrome C réductase	NADPH cytochrome C réductase
	Témoin	L.V.P. (10^{-7} M)	NaF (10^{-2} M)	Spécifique	Non spécifique				
Homogénat(A)	36	85	173	0,040	0,035	0,57	0,13	11,2	6,4
Culot aprés lyse en milieu hypotonique(B)	75	298	433	0,152	0,049	1,93	0,68	55,5	14,5
Membranes partiellement purifiées(C)	88	420	444	0,138	0,020	0,53	0,53	7,4	5,15
C/B	1,27	1,41	1,02	0,91	0,41	0,27	0,78	0,13	0,35
C/A	2,45	4,95	2,56	3,41	0,57	0,91	4,07	0,66	0,80

plasmiques de nombreux systèmes (103, 104, 109) et notamment sur les membranes plasmiques de rein (110) préparées par la méthode de Fitzpatrick et al (111). Ces enzymes sont parfois associées au récepteur (109) et leur présence constitue un inconvénient important pour l'étude de l'intéraction. Comme nous le montre clairement la figure 24, les membranes partiellement purifiées que nous avons utilisées ne dégradent pas la lysine-vasopressine même lorsque la concentration d'hormone dans le milieu est faible ($2,0 \times 10^{-8}$M) et après des temps de contact de 5, 10 et 20 minutes. Nous avons vérifié que l'accumulation de l'AMP cyclique mesurée en absence ou en présence de concentrations maximales de L.V.P. est proportionnelle au temps et à la concentration de protéine. La fixation spécifique de la L.V.P. $[^3H]$ est aussi proportionnelle à la concentration de protéine.

B) CARACTERISTIQUES CINETIQUES DE LA FORMATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR (HR)

1) Modèle simple de l'intéraction entre l'hormone et son récepteur

Afin de faciliter l'exposé des résultats, nous présenterons un modèle simple de l'intéraction entre l'hormone et son récepteur qui permet en première approximation de décrire l'ensemble des données expérimentales obtenues. Nous admettrons a priori que la fixation de l'hormone sur le récepteur est réversible et que les sites sont indépendants les uns des autres.

On peut écrire $[R]+[H] \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [RH]$ (2)

nous appellerons : $[R]$: la concentration du récepteur libre

$[H]$: la concentration de l'hormone libre au niveau de récepteur

$[RH]$: la concentration du complexe hormone-récepteur

$[RH_{eq}]$: la concentration du complexe hormone-récepteur à l'équilibre, pour une concentration d'hormone donnée

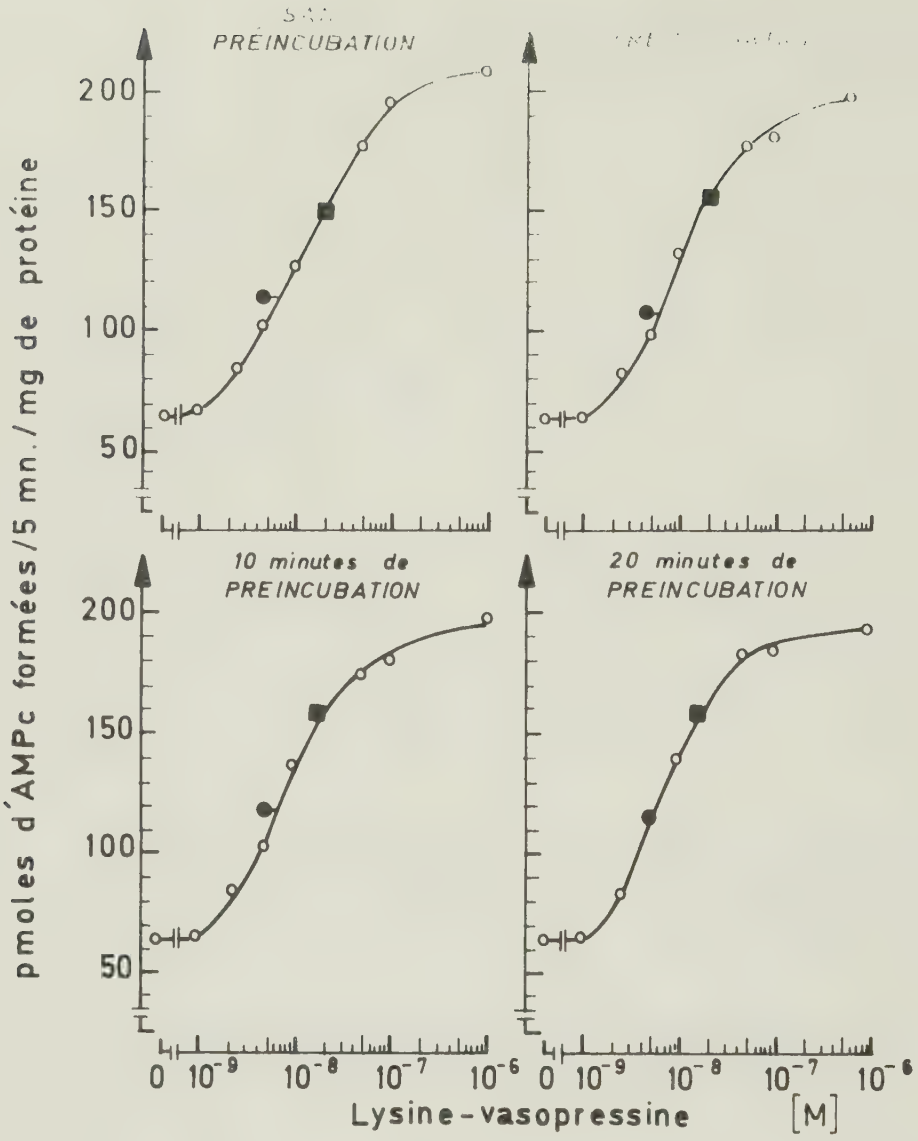


Figure 24 : CONTROLE DE LA STABILITE DE LA LYSINE-VASOPRESSINE EN PRESENCE DES MEMBRANES PLASMIQUES

Dans un premier groupe d'échantillons, 100 µl de milieu d'incubation, contenant 1,55 mg/ml de membranes, et sans ATP$[\alpha^{32}P]$ sont incubés pendant 0; 5; 10 et 20 minutes. A la fin du temps de préincubation, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 3000 g et 0°C. 25 µl du surnageant sont récupérés et placés dans des tubes contenant de l'ATP$[\alpha^{32}P]$, de la lysine-vasopressine et tous les éléments nécessaires pour réaliser des conditions d'incubation normales. La réaction est commencée en ajoutant 155 µg d'enzyme frais.

Un second groupe d'échantillons contenant 2 X 10^{-8}M ou 10^{-7}M de lysine-vasopressine est préincubé pendant 0; 5; 10 et 20 minutes en présence d'enzyme. Comme dans le premier groupe, 25 µl du milieu de préincubation sont prélevés après centrifugation des membranes. Les concentrations hormonales attendues dans le milieu d'incubation avec les membranes fraîches sont de 5,0 X 10^{-9}M (●) ou de 2,5 X 10^{-8}M (■). Les valeurs obtenues (moyenne de trois valeurs indépendantes) sont portées sur le graphique en utilisant comme abscisse la concentration attendue si aucune dégradation n'avait eu lieu. Quel que soit le temps d'incubation ou la concentration d'hormone dans le milieu, on n'observe pas de destruction significative de la lysine-vasopressine au contact de la préparation membranaire utilisée.

$[RT]$: la concentration totale du récepteur

k_1 et k_{-1} sont les constantes de vitesse des réactions de formation et de dissociation du complexe.

La vitesse de formation du complexe est égale à $\frac{d[RH]}{dt} = k_1[H][R] - K_{-1}[RH]$ (3), la vitesse de dissociation est donnée $\frac{-d[RH]}{dt} = k_{-1}[RH]$ (4). Dans nos conditions expérimentales, le nombre de molécules fixées à l'équilibre ne représente qu'une quantité négligeable (1% des molécules présentes à 10^{-8}M d'hormone). On peut donc considérer que la concentration hormonale H est constante. Dans ces conditions, les courbes d'association de l'hormone avec ses récepteurs et de dissociation de complexe $[RH]$ sont décrites par les équations suivantes $[RH]_{..} = [RH_{eq}]\left(1-e^{-(K_1[H] + k_{-1})t}\right)$ (5) pour l'association et $[RH] = [RH_o]\left(e^{-k_{-1}t}\right)$ (6) pour la dissociation ; RH_o est la concentration du complexe hormone-récepteur au moment où l'hormone libre est éliminée du milieu d'incubation.

2) Résultats

La fixation spécifique de la L.V.P. $[^3H]$ est rapide et limitée dans le temps (figure 25), 95% de l'hormone fixée est libérée lorsqu'on abaisse la concentration hormonale de 10^{-8}M à $4,7 \times 10^{-10}$M (fig.25). Les courbes expérimentales d'association et de dissociation peuvent être décrites de façon satisfaisante par les équations (5) et (6). Si l'on effectue les transformations semi-logarithmiques des courbes d'association et de dissociation, on obtient des droites (fig.25, partie inférieure). Les pentes de ces droites sont égales à $-k_{-1}$ pour la dissociation et $k_1[H] + k_{-1}$ pour l'association. Le calcul des constantes d'association (k_1) et de dissociation (k_{-1}) à partir des pentes des droites de régression linéaire donne les valeurs suivantes : $k_1 = 2,3 \times 10^{+7}$ M^{-1} $min.^{-1}$ et $k_{-1} = 0,035$ $min.^{-1}$. Ce qui correspond à une affinité de l'hormone pour ses récepteurs égale à $k_{-1}/k_1 = 1,5 \times 10^{-9}$M. La formation du complexe hormone-récepteur est très dépendante de la température (figure 26). Les temps nécessaires

pour obtenir 50% de la fixation maximale (à 10^{-8}M de L.V.P. $[^3H]$) sont respectivement de 2, 9, et 30 minutes aux températures de 30°c, 15°c et 0°c. La concentration du complexe [RH] à l'équilibre augmente légèrement lorsque la température du milieu d'incubation est abaissée. La vitesse initiale de formation du complexe hormone-récepteur est proportionnelle à la concentration d'hormone dans le milieu comme le prévoit l'équation $[RH] = [RH_{eq}]\left(1-e^{-(k_1 H + k_{-1})t}\right)$ La figure 27 montre les courbes d'association (partie supérieure) et leurs transformations semi-logarithmiques (partie inférieure) obtenues pour deux concentrations d'hormone marquée différentes. La pente des deux droites est égale à $k_1[H_1] + k_{-1}$ et $k_1[H_2] + k_{-1}$ pour des concentrations d'hormone égales à H_1 et H_2 . Il est donc possible de déterminer avec ce protocole les valeurs de k_1 et k_{-1}. Le tableau n° 8 donne les valeurs des constantes cinétiques déterminées sur trois préparations différentes, soit à partir des courbes d'association et de dissociation, soit à partir des courbes d'association obtenues à deux concentrations hormonales différentes. A 30°c, la constante d'association varie de 1,3 à 3 x $10^{-7}M^{-1}min^{-1}$, la constante de dissociation de 0,035 à 0,088 min^{-1}. Pour une même préparation (voir enzyme 3 - tableau 8), il y a une bonne correspondance entre l'affinité du système pour l'hormone déterminée par le rapport $k_{-1}/k_1 = 7{,}0 \times 10^{-9}$M ou directement sur la courbe de fixation de la L.V.P. $[^3H]$ en fonction de la dose soit 1,4 x 10^{-8}M (voir figure 33). A 15°c, la constante d'association est diminuée d'un facteur 3,7 et la constante de dissociation d'un facteur 2,6 par rapport aux valeurs de ces constantes déterminées à 30°c pour la même enzyme (voir tableau 8). L'affinité des récepteurs pour l'hormone est donc peu modifiée par un abaissement de la température.

C) SPECIFICITE DES RECEPTEURS DE LA LYSINE-VASOPRESSINE $[^3H]$

La spécificité de la liaison de la lysine-vasopressine tritiée sur ses récepteurs a été étudiée en comparant les capacités relatives de peptides, la lysine-vasopressine, l'ocytocine, l' (OMe)-Tyr^2-ocytocine et l'angiotensine à stimuler l'adényl cyclase, et leurs capacités

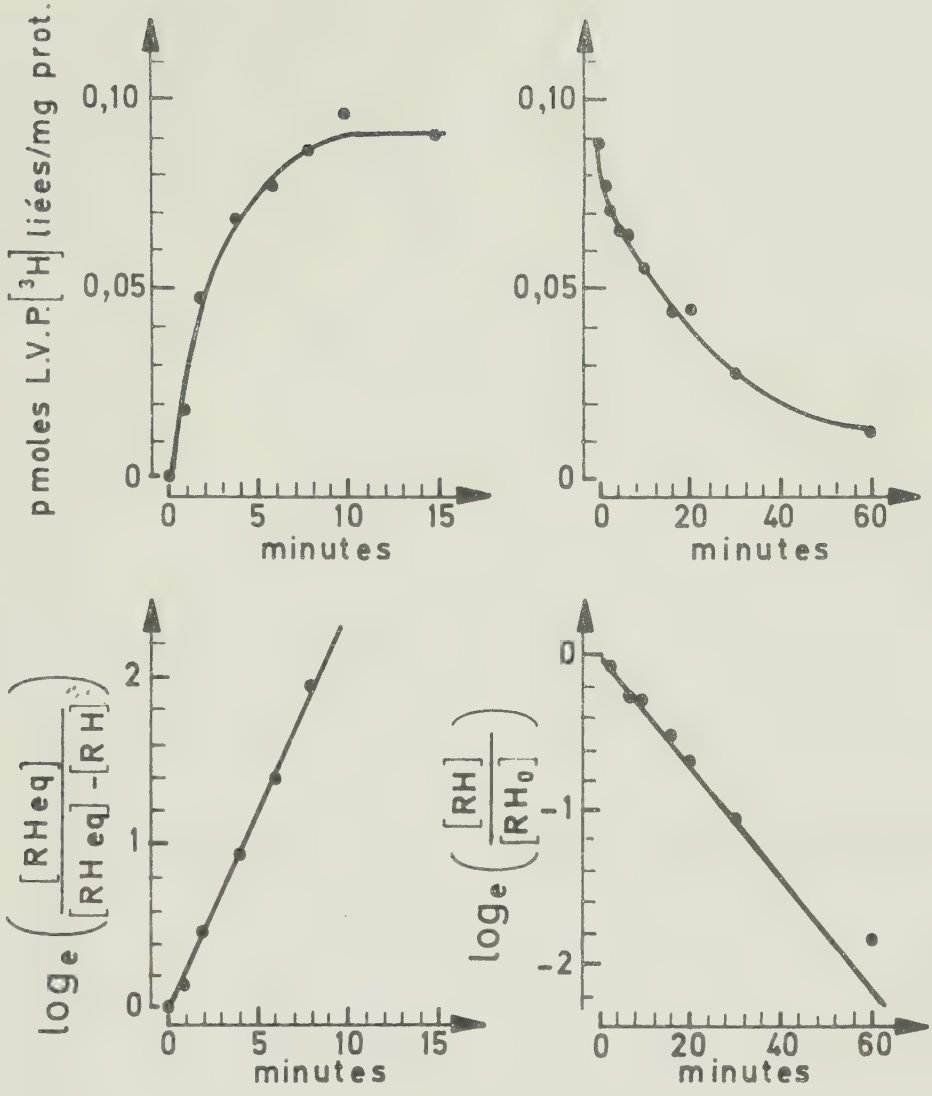


Figure 25 : CINETIQUE D'ASSOCIATION (partie de gauche) DE LA LYSINE-VASOPRESSINE AVEC SES RECEPTEURS. DISSOCIATION DE LA LIAISON LYSINE-VASOPRESSINE $[^3H]$-RECEPTEUR (partie de droite)

Les membranes (3,1 mg/ml) sont incubées à 30°C dans un volume final de 100 µl en présence de 10^{-8}M de L.V.P.$[^3H]$; la liaison est mesurée en fonction du temps (association - partie de gauche). Pour étudier la réversibilité de la liaison, on abaisse la concentration d'hormone à 5×10^{-10}M, après 15 minutes d'incubation, et sans changer la concentration des autres constituants du milieu (en ajoutant 2 ml de la solution A - voir "Méthodologie"). La liaison résiduelle est mesurée en fonction du temps qui suit la dilution.

Les transformations semi-logarithmiques des courbes d'association et de dissociation sont données dans la partie inférieure de la courbe

$[R]$ = la concentration du récepteur libre, $[RH]$ = la concentration du complexe hormone-récepteur, $[RH_{eq}]$ = la concentration du complexe $[RH]$ à l'équilibre, $[RH_o]$ = la concentration du complexe $[HR]$ au temps o de la dissociation.

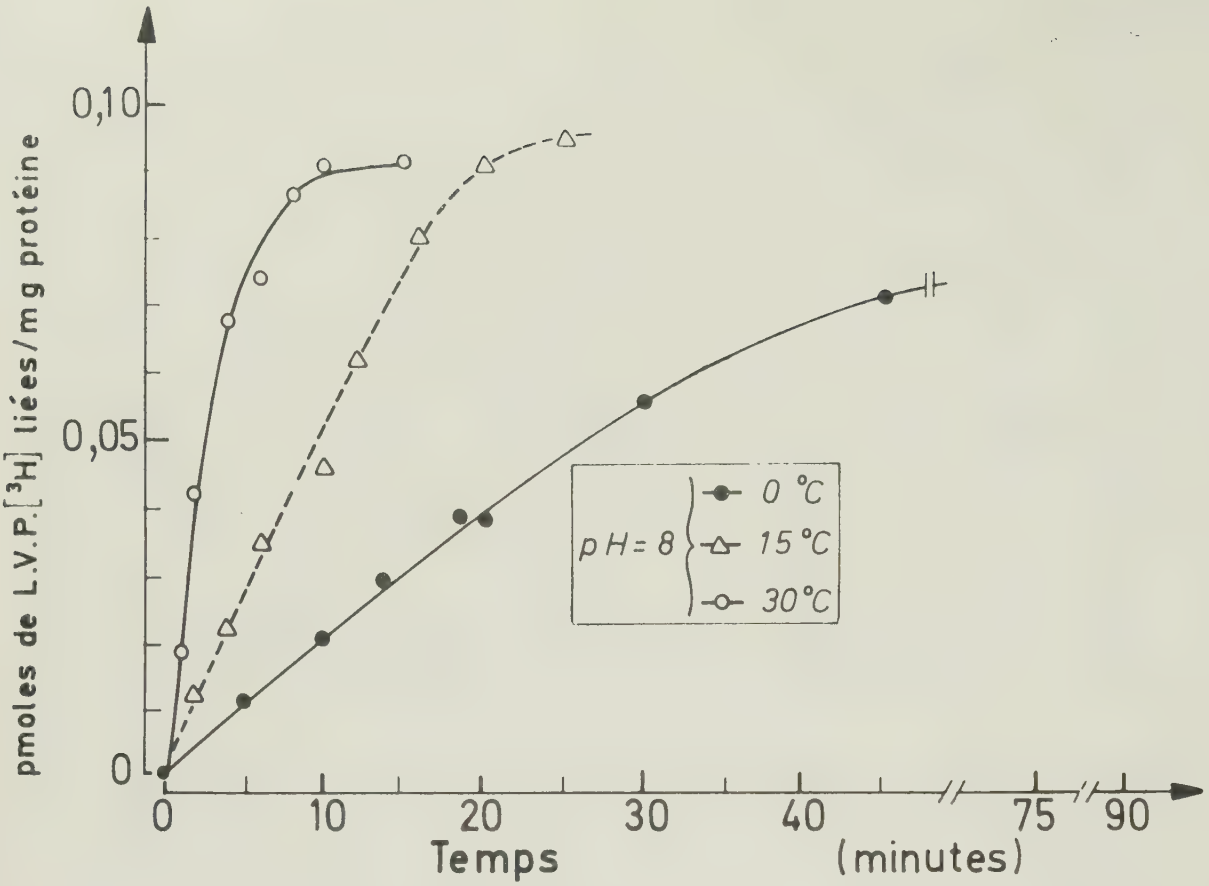


Figure 26 : EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA VITESSE DE FORMATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR

Les membranes (3,1 mg/ml) sont incubées à différentes températures pendant le temps indiqué, dans un volume final de 100 µl en présence de L.V.P.$[^3H]$ (10^{-8}M). La fixation d'hormone marquée est alors mesurée par la technique de filtration sur Millipore (voir "Méthodes"). La quantité d'hormone marquée fixée à l'équilibre augmente légèrement lorsqu'on abaisse la température. Cet effet est vraisemblablement dû à une meilleure stabilité des membranes incubées à basse température.

TABLEAU N° 8 CONSTANTES CINETIQUES DE L'INTERACTION DE LA LYSINE-VASOPRESSINE ^{3}H AVEC SES RECEPTEURS DES MEMBRANES PLASMIQUES DE REIN

Pour les préparations N°1et 2 ,les constantes d'association et de dissociation sont calculées indépendamment à partir de courbes d'association et de dissociation.

Pour la préparation membranaire N°3 ,les constantes sont calculées à partir de deux courbes d'association obtenues à deux concentrations hormonales différentes.

Préparation N°	Conditions expérimentales	Association [t=1/2] (min.)	$k_1 H + k_{-1}$ (min.)	k_1 ($M^{-1}min.^{-1}$)	k_{-1} ($min.^{-1}$)	k_{-1}/k_1 (M/l)
1	30°c ; pH 8 $H = 10^{-8}$ M	1,9	0,364	$2,3 \times 10^{+7}$	0,035	$1,5 \times 10^{-9}$
1	30°c ; pH 8 $H = 10^{-8}$ M	2,3	0,295	$2,6 \times 10^{+7}$	0,020	$8,0 \times 10^{-10}$
2	30°c ; pH 8 $H = 5 \times 10^{-9}$ M	2,0	0,340	$3,0 \times 10^{+7}$	0,036	$1,2 \times 10^{-9}$
3	30°c; pH 8					
	$H_1 = 2,0 \times 10^{-8}$ M	2,0	0,346			
	$H_2 = 5,0 \times 10^{-9}$ M	4,5	0,152	$1,3 \times 10^{+7}$	0,088	$7,0 \times 10^{-9}$
3	15°c ; pH 8					
	$H_1 = 2,0 \times 10^{-8}$ M	7,0	0,098			
	$H_2 = 5,0 \times 10^{-9}$ M	14,5	0,048	$3,5 \times 10^{+6}$	0,03	$8,7 \times 10^{-9}$

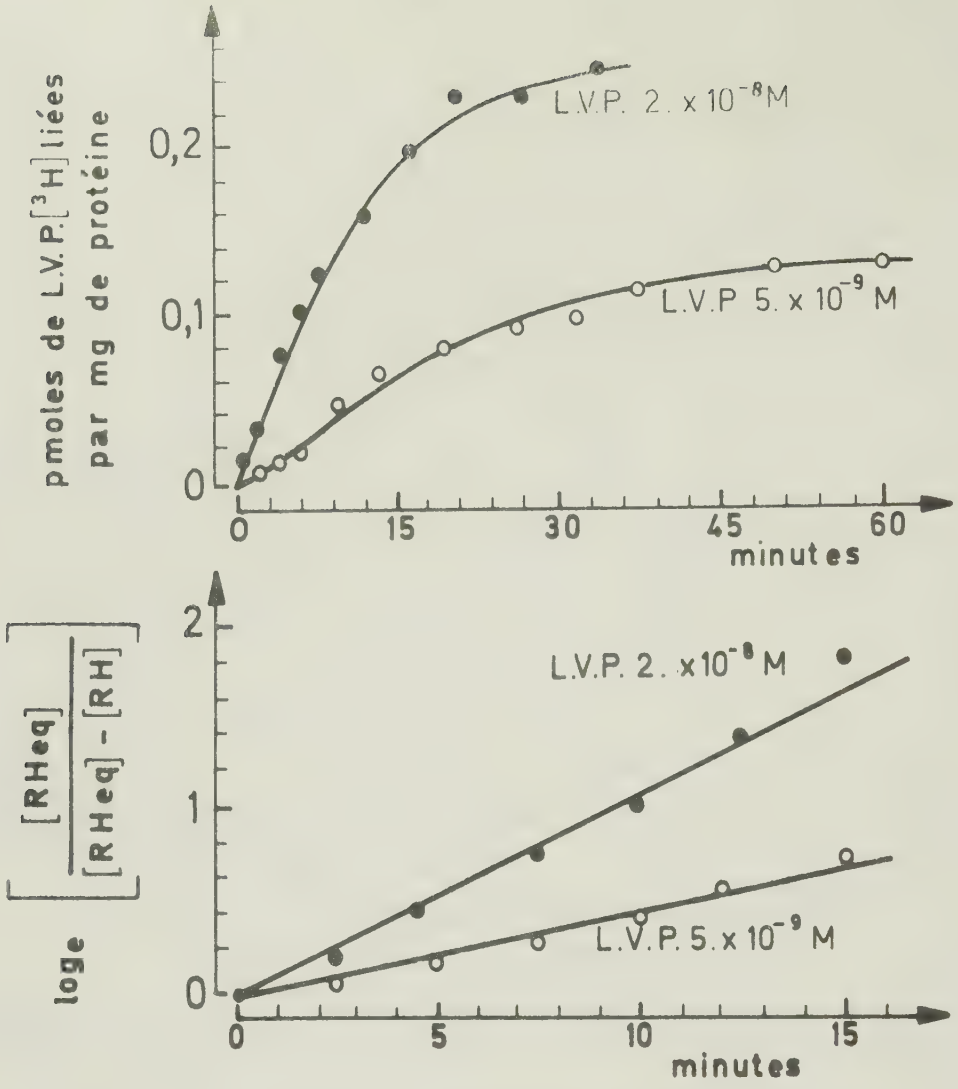


Figure 27 : EFFET DE LA CONCENTRATION D'HORMONE SUR LA VITESSE D'ASSOCIATION DE LA LYSINE-VASOPRESSINE $[^3H]$ AVEC SES RECEPTEURS DES MEMBRANES PLASMIQUES DE REIN

Les membranes sont incubées à 15°C en présence de 2,0 10^{-8}M (●) et 5 X 10^{-9}M (o) de lysine-vasopressine $[^3H]$. Notons que la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration hormonale.

Les transformations semi-logarithmiques des deux courbes d'association sont données dans la partie inférieure de la figure; les droites obtenues ont une pente égale à $k_1 [H] + k_{-1}$.

à entrer en compétition avec l'hormone marquée pour la liaison, au niveau du récepteur (fig.28). L'ocytocine qui ne diffère de la L.V.P. que par deux acides aminés a une affinité "apparente" pour le système adényl cyclasique 500 fois plus faible que celle de la lysine vasopressine. Elle ne produit pas le même effet maximum que la L.V.P. Enfin, un effet inhibiteur est observé aux plus fortes doses d'ocytocine. Cet effet que nous avions déjà remarqué lors des expériences sur la vessie des amphibiens, semble une propriété liée à la molécule d'ocytocine. L' (O-Me)-Tyr^2 ocytocine est capable de produire une activation maximale de l'adényl cyclase comparable à celle produite par la lysine-vasopressine. Toutefois, son affinité apparente est 1500 fois inférieure. L'angiotensine ne produit qu'une légère stimulation à des concentrations 10^5 fois plus élevées. Les mêmes rapports d'affinité sont obtenus si l'on étudie les capacités de la L.V.P., de l'ocytocine, de l' (O-Me)-Tyr^2 ocytocine, et de l'angiotensine, à déplacer la L.V.P. $[^3H]$ de ses récepteurs moléculaires (figure 28, partie inférieure). Pour chaque analogue non marqué, l'inhibition ne se produit que pour les concentrations qui activent l'adényl-cyclase. Elle est complète pour des concentrations donnant l'activation cyclasique maximale (10^{-7} M pour la L.V.P.). L'angiotensine n'inhibe pas la liaison même à très haute concentration, ce qui suggère qu'elle ne peut se lier aux récepteurs des peptides neurohypophysaires.

D) DISCUSSION

La possibilité de préparer des membranes de rein de porc partiellement purifiées nous a permis de déterminer avec une bonne précision les caractéristiques cinétiques de l'intéraction hormone-récepteur. L'évolution de la fixation en fonction du temps après addition de l'hormone peut être décrite par une fonction exponentielle. Si l'on abaisse la concentration de l'hormone dans le milieu, la liaison est réversible, la décroissance de la concentration du complexe [RH] peut être décrite par une fonction exponentielle. Les transformations

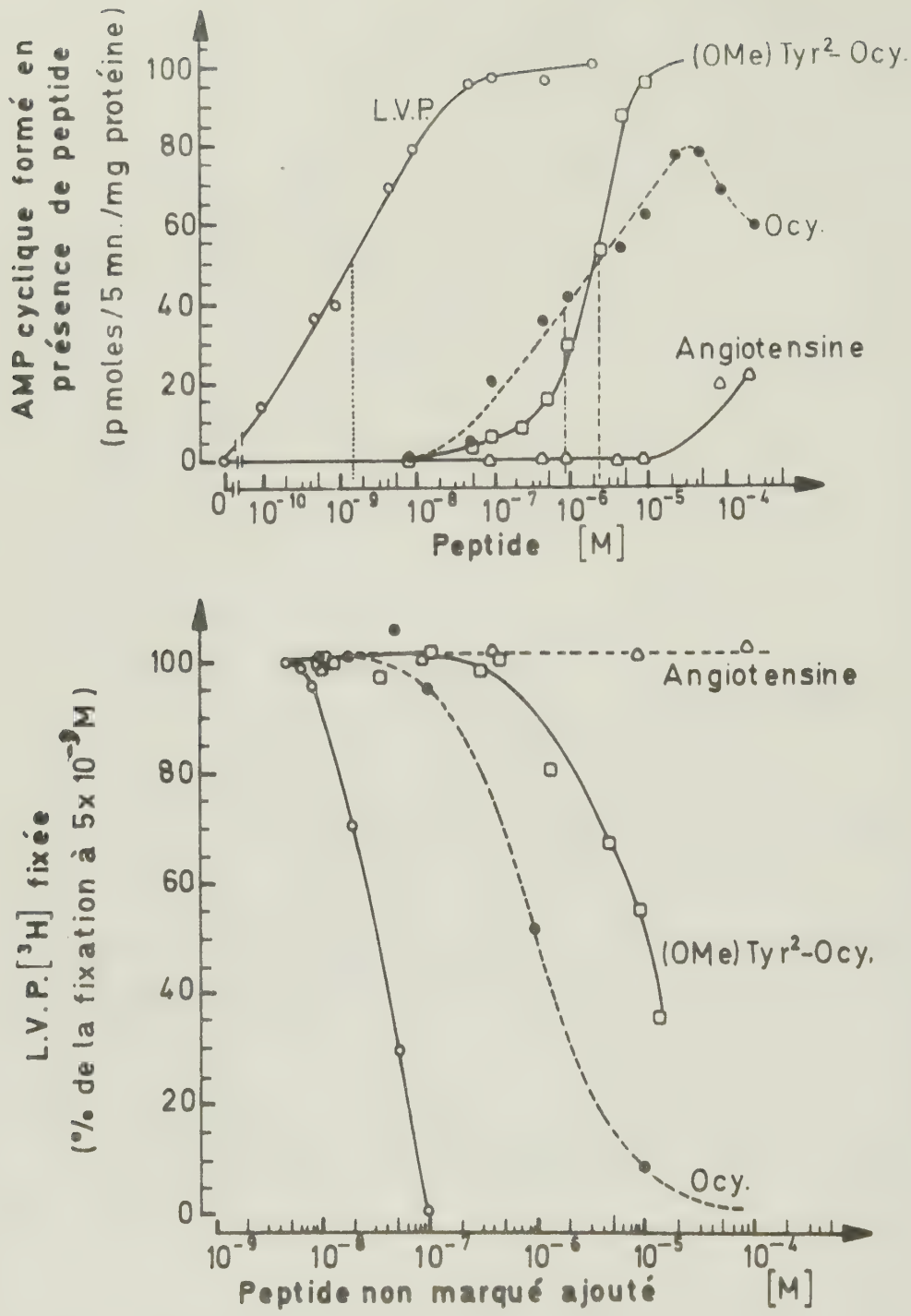


Figure 28 : SPECIFICITE DES RECEPTEURS DE LA LYSINE-VASOPRESSINE

- partie supérieure: les incubations sont faites à 30°C pendant 5 minutes. Les lignes en pointillés indiquent les valeurs des affinités apparentes des différents peptides pour le système adényl-cyclasique.
- partie inférieure: la liaison de la LVP$[^3H]$ (5 X 10^{-9}M) est mesurée à 30°C en présence de concentrations croissantes de peptide non marqué. La liaison de la LVP$[^3H]$ seule est de 0,075 pmole par mg de protéine. Les fixations obtenues sont exprimées en % de la fixation obtenue en l'absence de peptide non marqué dans le milieu d'incubation.

semi-logarithmiques des courbes d'association et de dissociation donnent une seule droite, suggérant que l'intéraction de l'hormone se fait avec une seule catégorie de sites récepteurs. Ces résultats indiquent également que le modèle d'intéraction proposé, inspiré des données classiques de l'enzymologie développées par Henri (112) et Michaelis-Menten (113) pour l'intéraction d'un substrat avec le site catalytique de l'enzyme est valable pour ce système. L'affinité du récepteur pour l'hormone peut être calculée par le rapport k_{-1}/k_1 , après avoir déterminé les constantes à partir des courbes d'association et de dissociation ou à partir de deux courbes d'association faites à 2 concentrations hormonales différentes. La vitesse initiale de formation du complexe est proportionnelle à la concentration d'hormone, ceci indique que le facteur limitant la formation du complexe [RH] est bien l'intéraction hormone-récepteur elle-même, et non un facteur physique, comme la diffusion, par exemple. La vitesse de formation du complexe est aussi très dépendante de la température (voir figure 26). La valeur de RH_{eq} à 0°c est supérieure de 20% à la valeur de RH_{eq} déterminée à 30°c et pour 10^{-8}M de L.V.P. [^{3}H]. Il est possible qu'une dégradation partielle des récepteurs se produise à 30°c. Il est intéressant de constater que la température affecte d'un facteur voisin les constantes d'association et de dissociation, si bien que l'affinité du récepteur pour l'hormone ne change pas. Les effets de la température sur la vitesse de formation du complexe hormone-récepteur constituent un autre argument contre la possibilité d'une interférence de la diffusion sur la vitesse de formation du complexe [RH]. Il est possible que la vitesse d'intéraction de l'hormone avec ses récepteurs soit le facteur limitant la vitesse de développement de la réponse physiologique finale mesurée sur le système intact. Rasmussen et al (114) puis Bourguet et al (115) ont montré que la vitesse initiale du développement de l'effet hydrosmotique de l'hormone, mesuré in-vitro sur la vessie des amphibiens est très dépendante de la température. L'amplitude de la réponse à l'équilibre est par contre très peu dépendante de la température. La spécificité

des récepteurs impliqués dans la stimulation de l'adényl cyclase est la même que celle déterminée à partir des expériences de compétition entre la L.V.P. [^{3}H] et un certain nombre de peptides non marqués (figure 29). La lysine vasopressine hormone antidiurétique naturelle chez le porc (106) est plus active que l'ocytocine. L'ocytocine est plus active que l' (O-Me)-Tyr^2 ocytocine. Le même ordre de spécificité a été trouvé en mesurant les activités spécifiques au mg de ces trois peptides sur le test antidiurétique pratiqué chez le rat (36). On peut constater que les courbes d'activation de l'adényl-cyclase par la lysine-vasopressine ou l' (O-Me)-Tyr^2 ocytocine ne sont pas parallèles (figure 28). La discussion de ce problème sera abordée dans le chapitre suivant (p. 101).

En conclusion, les arguments cinétiques, ainsi que la bonne corrélation entre les capacités de la lysine-vasopressine, l'ocytocine et l' (O-Me)-Tyr^2 ocytocine à stimuler l'adényl cyclase et la capacité de ces peptides à se lier aux sites de liaison de la L.V.P. [^{3}H], laissent supposer que ces sites sont les récepteurs physiologiques de l'hormone.

CHAPITRE QUATRIEME

L'ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE EST FONCTION DE LA CONCENTRATION DU COMPLEXE "HORMONE-RECEPTEUR"

L'ensemble des résultats présentés dans le chapitre précédent laisse penser que les sites de fixation de la L.V.P. $[^3H]$ sont aussi les sites impliqués dans l'activation de l'adényl cyclase. Ils peuvent être considérés comme les récepteurs de l'hormone. Cependant, la confrontation des résultats de l'étude cinétique de la formation du complexe d'une part, et de la formation d'AMP cyclique par l'adényl cyclase d'autre part, ont abouti à une contradiction apparente. Pour une concentration hormonale de 10^{-8}M le temps nécessaire pour atteindre 50% de la fixation maximale est de 2 minutes à 30°c et pH8, la fixation maximale n'est obtenue qu'après 10 minutes. Or , lorsqu'on mesure l'accumulation d'AMPc formé en fonction du temps et en présence de 10^{-8}M d'hormone, on obtient une relation linéaire passant par l'origine suggérant une activation immédiate de l'adényl cyclase par l'hormone. Cette contradiction a été soulignée lors de l'étude comparée de l'intéraction du glucagon (116-117) ou des catecholamines (118) avec les membranes de foie et de l'activation de l'adényl cyclase. Elle n'est en fait qu'apparente. En mesurant l'activité adényl-cyclasique pendant des périodes courtes, en fonction du temps qui suit l'addition d'hormone dans le milieu, nous avons montré que l'activation de l'adényl cyclase n'est pas immédiate. Pour une même concentration d'hormone, la cinétique d'activation de l'adényl cyclase est très comparable à la cinétique de fixation. La possibilité de mesurer simultanément la fixation et l'activation adényl-cyclasique nous a permis également de définir la relation quantitative qui existe entre ces deux phénomènes. Nous discuterons nos résultats dans le cadre des théories pharmacologiques classiques.

A) THEORIES PHARMACOLOGIQUES DE L'ACTIVATION

Deux théories ont été proposées pour expliquer les relations qui existent entre la formation du complexe hormone-récepteur, et la génération du stimulus physiologique qui en résulte. La plus classique consiste à admettre que l'intensité du stimulus (S) est fonction de la concentration du complexe [RH] formé, soit $S = k\,[RH]$ (7) c'est la théorie de l' "occupation" développée successivement par Clark (119), Ariens (120) puis Stephenson (121). La plus récente a été proposée par Paton (44). Elle postule que l'intensité du stimulus est une fonction du taux de formation du complexe [RH], c'est la "rate theory", (terme anglo-saxon qui signifie "théorie du renouvellement", dans la suite de l'exposé, nous conserverons le terme anglo-saxon) soit $S = k_1\,[H]\,[R]$ (8) avec $[R] = [RT] - [RH]$, soit $S = k_1\,[H]\,[RT - RH]$ (9) ; à l'équilibre l'intensité du stimulus est proportionnelle à la vitesse de dissociation du complexe soit $S = k_{-1}\,[RH_{eq}] = k_1\,[H]\,[RT\text{-}RH_{eq}]$ (la vitesse de formation du complexe est alors égale à la vitesse de dissociation). Dans ces deux théories, les courbes dose-réponses établies à l'équilibre ont les mêmes caractéristiques, seuls deux critères peuvent permettre de les distinguer :

1/ La relation entre l'amplitude du stimulus et la constante k_{-1}

En comparant l'activité à l'équilibre d'une série d'analogues, on doit pouvoir montrer qu'il existe dans le cas de la théorie de Paton une corrélation entre l'intensité du stimulus produit et la valeur de la constante de dissociation k_{-1} de chaque analogue. La réponse est d'autant plus grande que la constante de dissociation est élevée.

2/ L'évaluation de l'amplitude du stimulus en fonction du temps qui suit l'addition de l'hormone :

Les cinétiques de génération du stimulus doivent être différentes. Dans le cas de la théorie de l'occupation, la vitesse de la réaction croît en fonction du temps qui suit l'addition de l'hormone, pour

atteindre une valeur maximale lorsque $[RH] = [RH_{eq}]$. Dans le cas de la "rate theory", la vitesse est maximale sitôt après avoir ajouté l'hormone, lorsque RH = 0 (équation 9), puis décroît jusqu'à une valeur d'équilibre qui est atteinte lorsque $[RH] = [RH_{eq}]$. Paton a comparé (122) "the classical occupational model to an organ where the tone is emitted as long as the key is depressed" et la "rate theory" "to a piano where the sound comes out only when the key is first depressed and subsequently no more sound is heard".

B) APPLICATION DE LA THEORIE DE L'OCCUPATION AUX RECEPTEURS RENAUX DE LA LYSINE-VASOPRESSINE COUPLÉS AVEC L'ADENYL CYCLASE.

Nous avons mesuré de façon très précise l'accumulation en fonction du temps de l'AMP cyclique synthétisé par l'adényl cyclase. Après un temps d'équilibration thermique (de 0,75 minute) qui permet au milieu réactionnel de passer de 0°c à 30°c, l'accumulation est proportionnelle au temps d'incubation dans les échantillons qui ont reçu du fluorure (10^{-2}M) (figure 29). Lorsque la réaction est réalisée en présence d'une dose élevée d'hormone (10^{-7}M), l'accumulation de l'AMP cyclique formé est aussi linéaire en fonction du temps, par contre en présence d'une faible concentration (2×10^{-9}M) la vitesse d'équilibre de la réaction adényl-cyclasique est atteinte plusieurs minutes après l'addition de l'hormone (figure 29). En présence de 2×10^{-9}M de L.V.P. la stimulation adényl cyclasique est nulle deux minutes après le début de la réaction ; elle est de deux fois si l'on mesure l'accumulation pendant sept minutes. La vitesse initiale d'activation de l'adényl cyclase est donc proportionnelle à la concentration de l'hormone dans le milieu comme l'est la vitesse initiale de la formation du complexe hormone-récepteur (voir figure 27). La mesure cumulative de l'AMP cyclique synthétisé ne permet pas une estimation précise de la vitesse initiale d'activation ni du temps nécessaire pour obtenir la vitesse d'équilibre. Pour avoir une mesure correcte de cette vitesse initiale, nous avons utilisé le protocole décrit dans la légende de la figure 30.

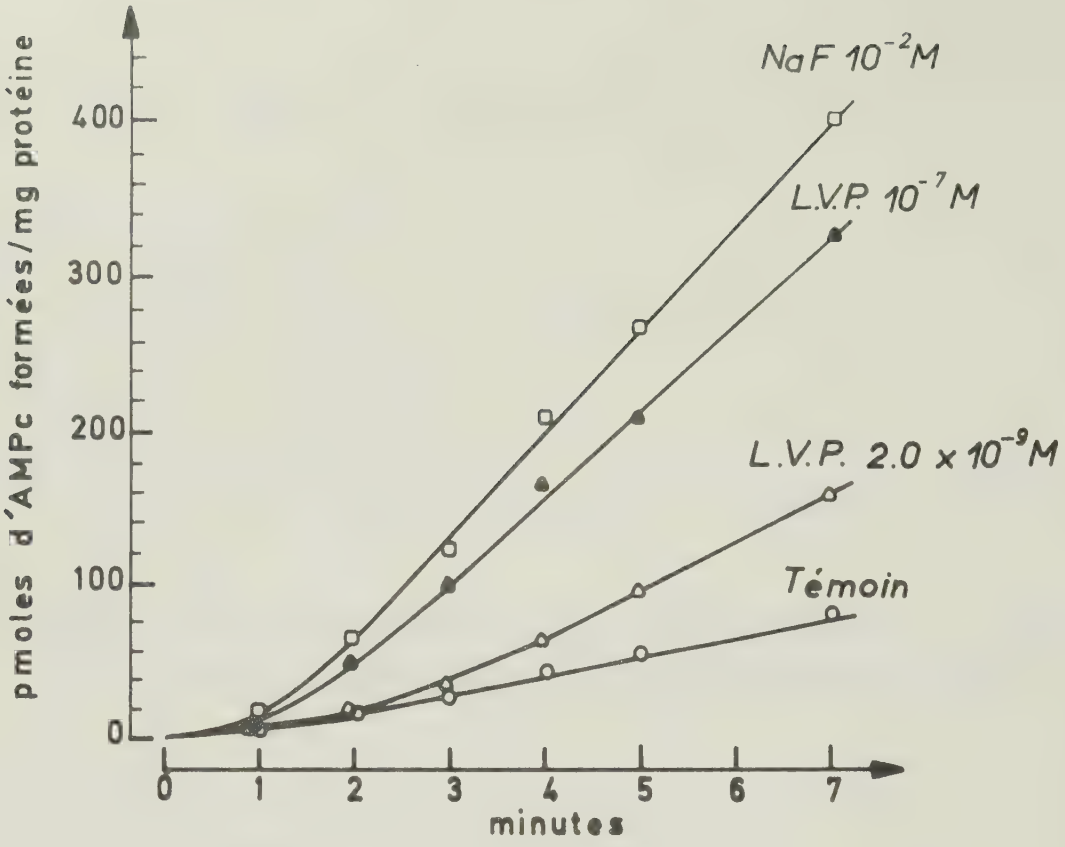


Figure 29 : ACCUMULATION DE L'AMP CYCLIQUE FORME EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE LYSINE-VASOPRESSINE OU EN PRESENCE DE FLUORURE DE SODIUM

Les membranes (330 µg dans 25 µl) conservées à 0°C sont ajoutées, au temps 0, au milieu d'incubation (75 µl maintenus à 0°C). Les échantillons sont alors incubés à 30°C. Les parties linéaires des courbes, obtenues en portant en fonction du temps, les activités adényl-cyclasiques des échantillons témoins ou stimulés par le NaF, coupent l'axe des abscisses au temps 0,75 minute. On peut considérer que ce temps est nécessaire pour que la température du milieu d'incubation passe de 0°C à 30°C. Les parties linéaires des courbes expérimentales obtenues, en portant en fonction du temps, les activités adényl-cyclasiques mesurées en présence de 10^{-7}M et 2×10^{-9}M de L.V.P., coupent l'axe des abscisses respectivement aux temps 1,25 et 2 minutes. En présence de 2×10^{-9}M de L.V.P., la stimulation est nulle après 2 minutes d'incubation, puis augmente progressivement jusqu'à sa valeur d'équilibre. La stimulation par l'hormone de l'activité adényl-cyclasique n'est pas immédiate. Le temps nécessaire pour obtenir la stimulation optimale dépend de la concentration hormonale.

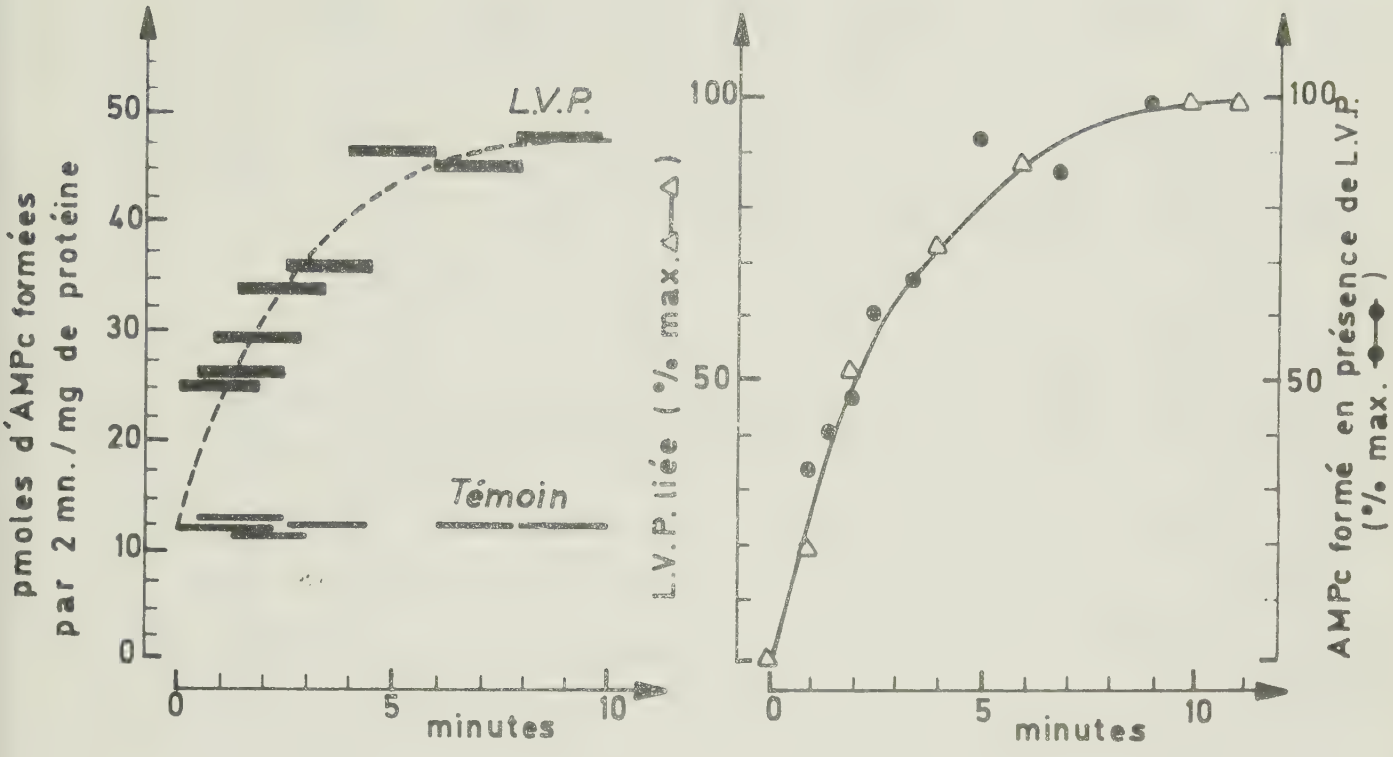
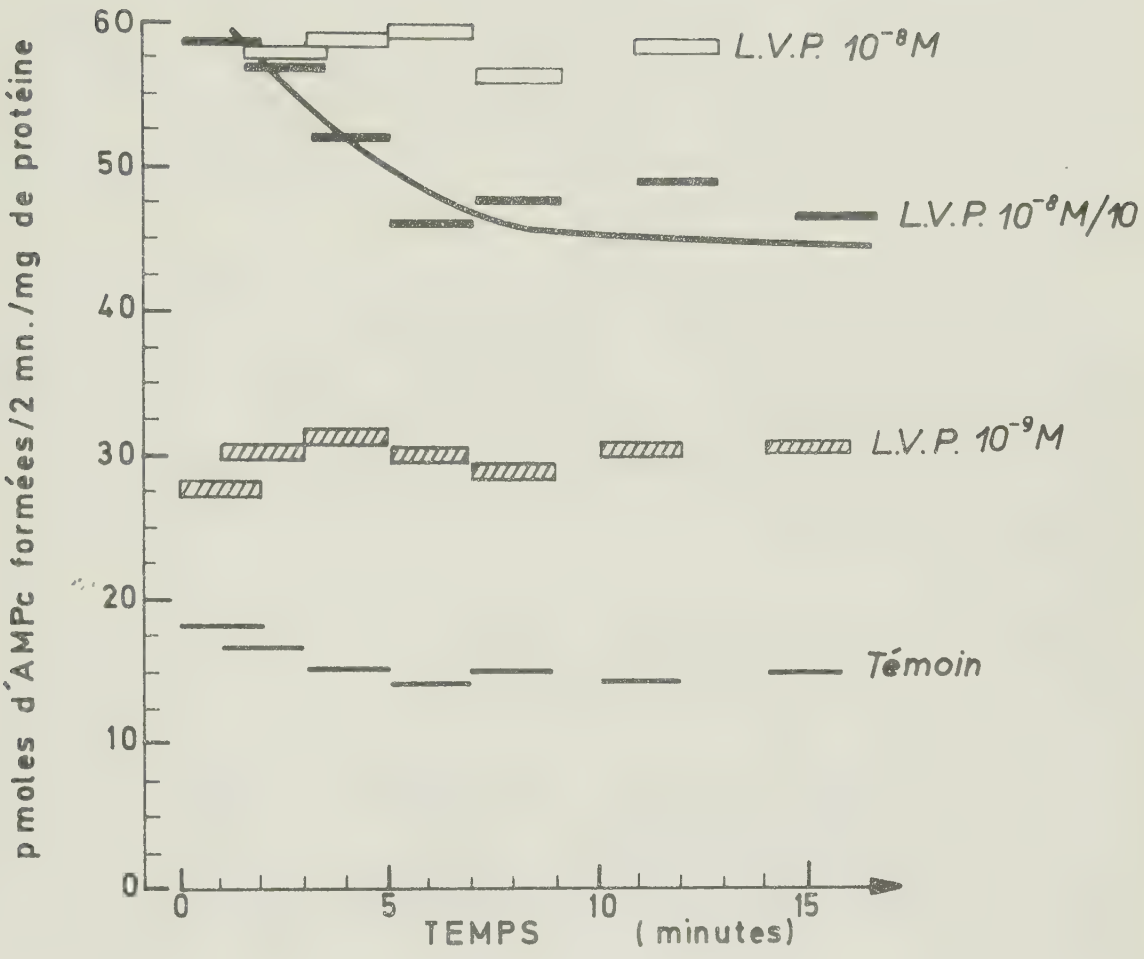


Figure 30 : CINETIQUE D'ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE PAR LA LYSINE VASOPRESSINE

Les membranes (2,9 mg de protéine dans 0,8 ml) et deux milieux d'incubation identiques à ceux utilisés pour le dosage de l'adényl cyclase mais ne contenant pas de $[\alpha^{32}P]$ ATP ont été prééquilibrés séparément à 30°C. L'un des milieux d'incubation contient de la LVP en quantité telle que sa concentration finale après addition des membranes soit 10^{-8}M (▬). L'autre milieu d'incubation ne contient pas de LVP et est utilisé pour la détermination des valeurs témoins. A la fin du temps de préincubation, les membranes et les milieux d'incubation sont mélangés et agités constamment à 30°C. A des temps variables après le mélange, des prélèvements de 150 µl ont été effectués et immédiatement incubés à 30°C dans des tubes contenant 20 µl d'ATP $\alpha^{32}P$ (1,5 µCi). La réaction adényl-cyclasique dure 2 minutes. Les valeurs expérimentales sont la moyenne de 3 points expérimentaux. Les abscisses des extrémités de chaque barre horizontale indiquent le début et la fin de la période pendant laquelle l'activité adényl-cyclasique est mesurée. Dans la partie droite de la figure, le pourcentage de l'activation de l'adényl cyclase est porté en fonction du temps (●). 100% d'activation correspondent à la stimulation maximale obtenue à 10^{-8}M de LVP. Les valeurs moyennes sont portées en fonction du temps correspondant au milieu de chacune des périodes de dosage de 2 minutes. La cinétique de fixation de lysine vasopressine tritiée (10^{-8}M) (Δ) à 30° est montrée sur la même figure, 100% de fixation correspondent à la valeur d'équilibre de fixation à 10^{-8}M qui dans ce cas est égale à 0,093 pMole de LVP $[^3H]$ fixée par milligramme de protéine.

Il permet de suivre pendant des périodes courtes (2 minutes) l'évolution de l'activation de l'adényl cyclase en fonction du temps qui suit l'addition de l'hormone. La vitesse de la réaction adényl-cyclasique croît en fonction du temps suivant l'addition de l'hormone (fig. 30, partie de gauche). La cinétique d'activation de l'adényl cyclase par une concentration de L.V.P. de 10^{-8}M est comparable à la cinétique d'intéraction entre la lysine vasopressine (10^{-8}M) - $[^3H]$ et ses récepteurs. De même, la stimulation de l'adényl-cyclase n'est pas immédiatement réversible lorsque la concentration hormonale est réduite d'un facteur 10 (de 10^{-8} à 10^{-9}M), après 15 minutes d'incubation (voir figure 31). Si l'on considère que l'activation de l'adényl-cyclase est une conséquence directe de l'intéraction hormone-récepteur, les résultats précédents suggèrent que l'intensité du stimulus primaire est à tout moment fonction de la concentration du complexe hormone-récepteur. Ils excluent la théorie du renouvellement dans le système étudié. Dans de nombreuses études (y compris des expériences présentées dans notre travail), les courbes dose-activités adényl-cyclasiques sont établies en mesurant l'accumulation de l'AMP cyclique formé pendant un temps relativement court (5 à 10 minutes). Dans ces conditions, les activités adényl-cyclasiques mesurées en présence de faibles concentrations d'hormone sont sous- estimées puisque le temps nécessaire pour obtenir l'activation optimale de l'adényl cyclase est d'autant plus long que la concentration d'hormone dans le milieu est plus faible. De plus, ce temps est relativement long pour les concentrations hormonales basses, Il est de 10 minutes pour une concentration d'hormone de 10^{-8}M. Cette conclusion est illustrée par la figure 32 qui compare les courbes dose-activités adényl-cyclasiques obtenues, lorsqu'on mesure l'activité cyclasique entre 0 et 3 minutes, 0 et 15 minutes et entre 14 et 17 minutes après avoir ajouté l'hormone dans le milieu. Pour les concentrations les plus élevées d'hormone (doses supérieures au km), les vitesses de réaction sont indépendantes de la période de mesure. Pour ces concentrations, le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre est court.



gure 31 : REVERSIBILITE DE LA STIMULATION DE L'ADENYL CYCLASE

Quatre échantillons (contenant 0,51 mg de membranes chacun) sont préincubés à 30°C pendant 15 minutes dans 250 µl d'un milieu d'incubation standard ne contenant pas d'ATP $[\alpha^{32}P]$. Deux d'entre eux contiennent 10^{-8}M de LVP, un autre contient 10^{-9}M de LVP, le dernier ne contient pas d'hormone. Après cette période de préincubation à 30°C, les 4 échantillons sont amenès à un volume final de 2,5 ml avec une solution ne modifiant pas les concentrations des composants du milieu standard. Pour 3 échantillons, la concentration de LVP est maintenue au cours de cette dilution à sa valeur initiale: 10^{-8}M (▭), 10^{-9}M (▨) et 0 LVP (—), tandis que dans l'échantillon expérimental la concentration de LVP est réduite de 10^{-8}M à 10^{-9}M (▬). Des prises de 150 µl sont faites à des temps variables après avoir amené le volume final à 2,5 ml. Elles sont immédiatement incubées à 30°C dans des tubes contenant 20 µl d'ATP$[\alpha^{32}P]$ 5 µCi . La réaction adényl-cyclasique dure 2 minutes. Les valeurs expérimentales sont la moyenne de trois points expérimentaux. Les abscisses des extrémités de chaque barre horizontale indiquent le début et la fin de la période pendant laquelle l'activité adényl-cyclasique est mesurée. La dilution des milieux d'incubation est réalisée au temps t = 0.

Aux faibles concentrations d'hormone, la différence entre les trois courbes est très apparente. Pour une concentration de L.V.P. de 10^{-10}M, l'activation de l'adényl cyclase est supérieure à deux si la mesure de l'activité est faite entre 14 et 17 minutes après l'addition de l'hormone. Elle est nulle si on fait la mesure entre zéro et trois minutes.

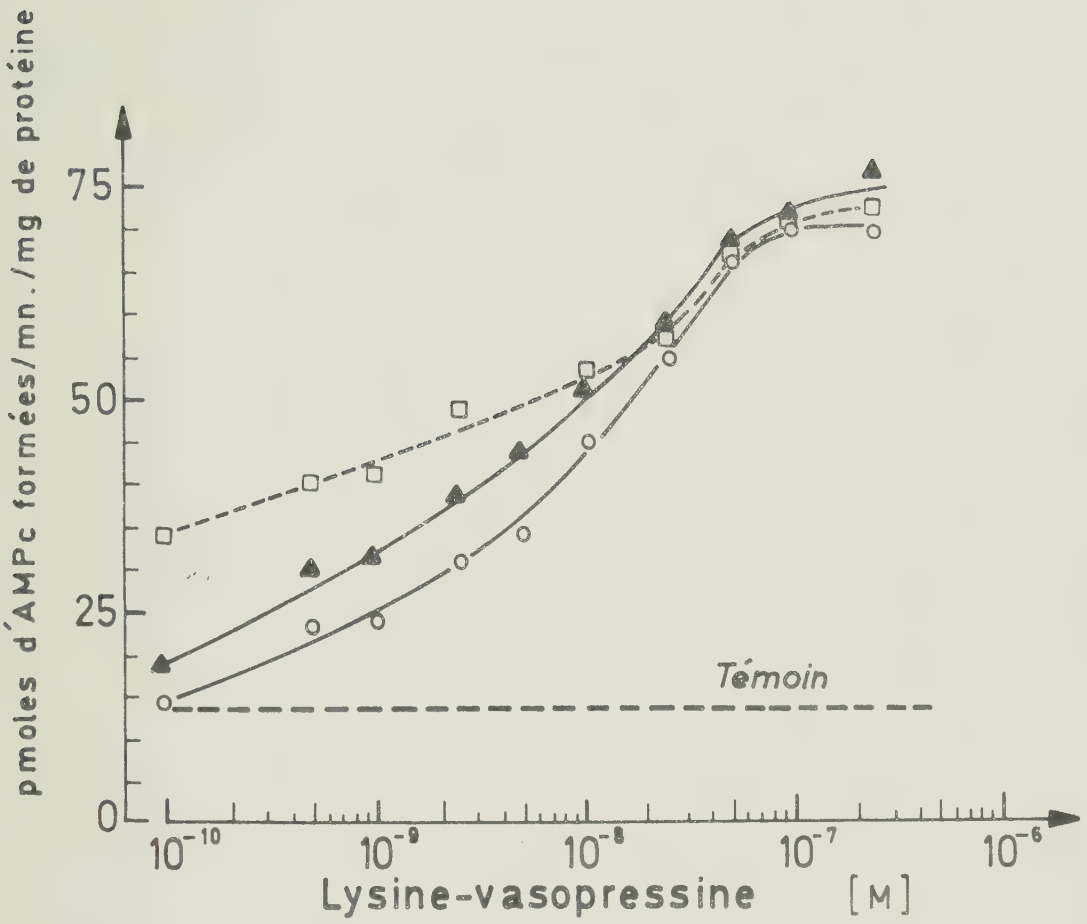
Lorsque l'activation de l'adényl cyclase est mesurée dans des conditions où l'équilibre de fixation de l'hormone sur son récepteur n'est pas atteint, la concentration d'hormone assurant 50% de l'activation maximale donne une estimation par défaut de l'affinité apparente du système pour l'hormone.

C) NON LINEARITE DE LA FONCTION DE "COUPLAGE"

1) Notion de "couplage" entre le récepteur et l'adényl cyclase

Par couplage récepteur-adényl cyclase nous désignerons l'ensemble des évènements conduisant de l'intéraction hormone-récepteur à l'augmentation de l'activité catalytique de l'adényl cyclase.

Malgré l'analogie fonctionnelle existant entre l'adényl cyclase sensible aux hormones et les enzymes régulateurs, il est difficile de considérer le récepteur comme un site régulateur de la molécule d'adényl cyclase. De nombreux arguments suggèrent au contraire que le récepteur et l'adényl cyclase sont deux entités moléculaires distinctes (voir par exemple 109). Parmi ceux-ci nous en retiendrons un qui nous semble particulièrement significatif. L'adényl cyclase des cellules adipeuses de rat est stimulée par le glucagon, la sécrétine, les catécholamines, la TSH, la LH et l'ACTH. Chacune de ces hormones se fixe sur un récepteur spécifique différent mais active la même unité catalytique (les stimulations produits par ces différentes hormones ne sont pas additives). Il a été montré par Braun et Hechter (123) que les cellules adipeuses provenant d'animaux hypophysectomisés ont perdu



igure 32 : ACTIVITES ADENYL-CYCLASIQUES MESUREES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LYSINE-VASOPRESSINE PENDANT DIFFERENTES PERIODES DE TEMPS APRES L'ADDITION DE L'HORMONE DANS LE MILIEU

L'hormone est ajoutée au temps 0. L'activité cyclasique est mesurée à 30°C entre: 0 et 3 minutes (O); 0 et 15 minutes (▲) ou 14 et 17 minutes (□) en ajoutant l'ATP$[\alpha^{32}P]$ au début de ces périodes (0,65 µCi dans 10 µl). La concentration des membranes est de 3,3 mg/ml. Les activités adényl-cyclasiques sont exprimées en pmoles d'AMPc formées par minute et par mg de protéines membranaires.

Les n de Hill calculés pour ces trois courbes sont respectivement de 0,75 (O); 0,52 (▲) et 0,3 (□).

la capacité de répondre à l'ACTH, mais restent stimulables par les autres hormones. Le traitement des animaux par les glucocorticoïdes restaure la sensibilité à l'ACTH. L'intégrité des mécanismes de biosynthèse des protéines est indispensable à cette restauration. Les glucocorticoïdes pourraient contrôler la synthèse du récepteur ou d'un élément indispensable au couplage sans modifier l'activité catalytique de l'adényl cyclase.

On considère généralement (109) que le système adényl-cyclasique est composé d'une unité catalytique qui transforme l'ATP en AMPc, et d'une ou plusieurs unités régulatrices "couplées" à la molécule catalytique au sein de la membrane. L'unité (ou les) réceptrice est chargée de reconnaître le message hormonal et de le transmettre à la molécule catalytique avec laquelle elle est couplée.

La nature du "couplage" est en grande partie inconnue. L'activation pourrait résulter : 1) soit de la libération d'un produit intermédiaire, ou d'une transformation chimique de l'adényl cyclase (on connaît le cas d'un certain nombre d'enzymes comme la phosphorylase ou la phosphorylase kinase dont l'activité est modulée par l'intermédiaire d'une phosphorylation réversible (Walsh et al 1968 (124)) ; 2) soit d'une intéraction directe récepteur-adényl cyclase modifiée au cours de l'action hormonale, analogue par exemple au mécanisme d'activation des protéines kinases par l'AMP cyclique (Yamamura et al 1971 (125)).

Rappelons que la protéine kinase est composée d'une unité catalytique qui phosphoryle le substrat protéique à partir d'ATP et d'une unité régulatrice qui interragit avec l'AMP cyclique. Lorsque l'AMP cyclique se fixe sur l'unité régulatrice, il y a dissociation des unités catalytique et régulatrice. L'unité catalytique "libérée" a une activité plus élevée que lorsqu'elle est complexée à l'unité régulatrice.

L'intéraction hormone-récepteur pourrait également contrôler l'activité de l'adényl cyclase par l'intermédiaire d'une modification de la structure membranaire.

Quoiqu'il en soit, il a été souvent implicitement admis (38-40-109-116-117-127) dans les études de corrélations entre la fixation de l'hormone et l'activation de l'adényl cyclase qu'une relation linéaire devait exister entre ces deux paramètres. Une telle relation a été effectivement trouvée dans des conditions où l'équilibre de fixation de l'hormone sur son récepteur n'était peut-être pas atteint (38-40-109-116-117-127). Dans la mesure où l'activation est fonction de l'occupation des récepteurs, il nous a paru intéressant d'analyser la fonction de couplage dans des conditions d'équilibre.

2) Résultats expérimentaux

Cette étude repose sur la mesure en fonction de la concentration d'hormone dans le milieu, de la fixation de L.V.P. $\left[^3H\right]$ à l'équilibre et de l'activation de l'adényl cyclase lorsque cet équilibre de fixation est atteint (cette mesure a été effectuée entre 14 et 17 minutes après l'addition d'hormone dans le milieu.)

Comme le montre la figure 33, les évolutions de la fixation de L.V.P. et de l'activation de l'adényl cyclase ne sont pas parallèles. L'activation maximale de l'adényl cyclase et la saturation des récepteurs sont obtenues pour la même concentration d'hormone dans le milieu. Cependant à 10^{-10}M d'hormone dans le milieu 2% seulement des sites sont occupés alors que l'activation est déjà importante (22% de l'activation maximale). Si l'on porte la stimulation relative de l'adényl cyclase (en % de la stimulation maximale) en fonction de l'occupation relative du récepteur (en % de la capacité maximale), on obtient une relation qui se rapproche d'une hyperbole de saturation. En d'autres termes, pour un même accroissement d'occupation des récepteurs l'activation relative de l'adényl cyclase qui en résulte est d'autant plus faible que l'occupation totale des récepteurs est grande.

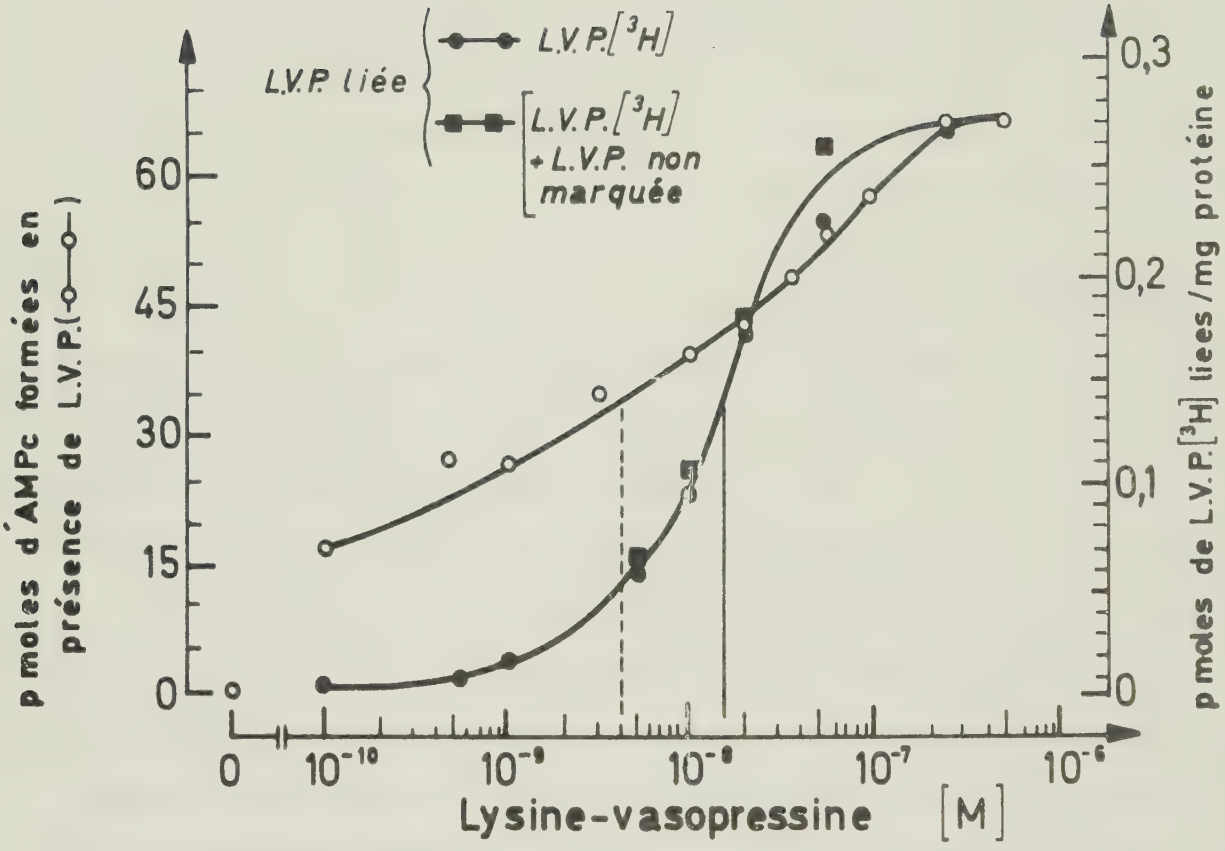


Figure 33 : RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES ADENYL-CYCLASIQUES ET LA FIXATION DE LYSINE-VASOPRESSINE $[^3H]$ MESUREES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION HORMONALE

La liaison de la LVP $[^3H]$ avec ses récepteurs est mesurée après 15 minutes d'incubation à 30°C. La ligne verticale en trait plein indique la valeur du km apparent pour la liaison ($1,3 \times 10^{-8}$M).

Pour mesurer l'activation de l'adényl cyclase (O) dans des conditions voisines de l'équilibre, les membranes et la LVP sont incubées à 30°C pendant 14 minutes dans les conditions standards sans ATP $[\alpha^{32}P]$. 10 µl d'ATP $[\alpha^{32}P]$ sont alors ajoutés et la réaction arrêtée 3 minutes après. L'activité cyclasique de base est de 13,5 pmoles d'AMPc formées par minute et par mg de protéine. La ligne verticale en traits pointillés indique le km apparent pour l'activation (km = 40×10^{-9}M). La concentration des membranes est de 3,3 mg/ml.

D) DISCUSSION ET CONCLUSION

L'apparente contradiction entre la cinétique de fixation de l'hormone sur ses récepteurs et la cinétique d'activation de l'adényl cyclase ne résiste donc pas à l'analyse. Lorsqu'on mesure les activités adényl-cyclasiques pendant des périodes courtes et à des temps variables après l'addition de l'hormone, on peut clairement montrer que l'activation de l'adényl cyclase est progressive. La vitesse initiale de cette activation dépend de la concentration d'hormone. Pour une même concentration (10^{-8}M), il y a une bonne corrélation entre la vitesse d'activation de l'adényl cyclase et la vitesse d'intéraction de l'hormone avec son récepteur. S'il n'y a pas de réaction intermédiaire entre l'intéraction et l'activation, cette expérience montre bien que le stimulus (l'activation) est à tout moment proportionnel à la concentration du complexe hormone-récepteur. La réversibilité de la stimulation est également progressive et donc probablement limitée par la vitesse de dissociation du complexe formé entre l'hormone et son récepteur. Lorsqu'on compare les résultats obtenus en mesurant l'activation adényl-cyclasique à l'équilibre (entre 14 et 17 minutes suivant l'addition de l'hormone) en fonction de la concentration hormonale, et la courbe de fixation, il est clair que la relation : occupation des récepteurs - activation de l'adényl cyclase n'est pas linéaire mais se rapproche d'une hyperbole de saturation. Les caractéristiques cinétiques de cette relation restent à définir, de même que sa signification physiologique. On peut cependant remarquer que pour une faible variation de l'occupation des récepteurs, l'activation est proportionnellement plus importante lorsque la concentration d'hormone est plus faible. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce "couplage" non linéaire :

1/ la population des récepteurs étudiés est hétérogène. Plusieurs catégories de récepteurs existent avec des affinités différentes pour l'hormone. Si les récepteurs qui ont la meilleure affinité sont aussi ceux qui sont les plus efficaces à stimuler l'adényl cyclase, on peut

rendre compte des résultats. Cependant, aucune de nos données expérimentales ne suggère l'existence d'une telle hétérogénéité.

Les transformations semi-logarithmiques des courbes d'association et de dissociation, donnent une seule droite(voir figure 27). Le coefficient de Hill est égal à 1,1 pour la courbe dose-fixation de la L.V.P. $[^3H]$ déterminée à l'équilibre.

2/ le "couplage" non linéaire est une propriété intrinsèque du système. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. D'une part, on peut imaginer que l'intéraction hormone-récepteur entraîne la libération d'un produit qui activerait l'adényl cyclase. La relation liant la libération de ce produit à la concentration du complexe [HR] pourrait être une fonction saturable. Hechter et al (126) ont proposé que le complexe [HR] pourrait former avec le Ca^{++} membranaire un complexe ternaire $H\text{-}R\text{-}Ca^{++}$, seul capable de stimuler l'adényl cyclase. Les prostaglandines seraient également un candidat potentiel pour ce rôle de messager entre le récepteur et l'adényl cyclase. D'autre part, le coefficient de Hill calculé à partir des courbes d'activation de l'adényl cyclase à l'équilibre est inférieur à 1($n = 0,43 \pm 0,13$) est suggestif d'un phénomène de coopérativité négative, tel que l'ont défini Koshland et al (93). Si l'on suppose que l'adényl cyclase est un polymère formé de sous unités composées chacune d'une unité catalytique et d'une unité réceptrice, que la transition entre la forme inactive et la forme active de l'unité catalytique peut être induite soit par l'occupation du récepteur correspondant, soit par la transition des unités catalytiques voisines, on peut également expliquer le couplage non linéaire observé.

Les résultats de l'expérience représentée par la figure 30, comparant la vitesse de formation du complexe hormone-récepteur avec la vitesse d'activation de l'adényl cyclase, sont apparemment incompatibles avec la conclusion précédente puisque l'on observe des évolutions parallèles de l'occupation du récepteur et de l'activation de l'adényl cyclase suggérant un couplage linéaire. Il convient cependant de remarquer que :

1) cette conclusion n'est valable que s'il n'existe aucune constante de temps entre l'occupation du récepteur et l'activation de l'adényl cyclase.

2) dans cette expérience, une très faible variation de l'occupation des récepteurs est explorée. La première détermination de l'activation adényl-cyclasique par l'hormone est effectuée entre 0 et deux minutes, temps au bout duquel 15% des récepteurs totaux sont occupés pour une concentration hormonale de 10^{-8}M ; l'équilibre correspondant à la saturation de 30% des récepteurs totaux. Entre 2 et 10 minutes, la fraction des récepteurs occupés passe donc de 15 à 30% des récepteurs totaux. Cette variaton correspond à la partie de l'hyperbole de saturation représentant la fonction de "couplage" pour laquelle la dérivée est voisine de l'unité, aussi peut-on rendre compte d'un "couplage" apparemment linéaire. Les courbes d'activation de l'adényl cyclase par la lysine-vasopressine ou l'(OMe) Tyr^2ocytocine ne sont pas parallèles (fig.28).Dans l'expérience décrite dans la figure 28, les activités adényl-cyclasiques sont mesurées entre 0 et 5 minutes après l'addition de l'hormone. Deux hypothèses peuvent être faites pour expliquer cette différence de comportement entre la L.V.P. et l'(OMe)Tyr^2-ocytocine. L'intéraction de l'analogue avec les récepteurs est plus lente que celle de la L.V.P. Dans ces conditions pour les plus basses concentrations de peptide, la L.V.P. occupe davantage de sites récepteurs que l'(OMe)Tyr^2 ocytocine puisque les mesures ne sont pas faites à l'équilibre. On peut également supposer que la fonction de couplage est différente pour ces deux peptides. Un couplage linéaire dans le cas de l'(OMe)-Tyr^2 ocytocine et non linéaire dans le cas de la L.V.P. peut expliquer les résultats présentés dans la figure 28.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Arrivés au terme de l'exposé de notre travail, nous nous proposons de résumer et de discuter ici les principales conclusions qui nous paraissent constituer un apport original à l'étude des premières étapes du mécanisme d'action des hormones polypeptidiques.

Seule l'utilisation d'hormones peptidiques marquées permet la détermination de paramètres importants comme la densité cellulaire des sites récepteurs, les constantes cinétiques de l'intéraction hormone récepteur, ou les relations existant entre l'intéraction primaire et l'une de ses conséquences immédiates, l'activation de l'adényl cyclase membranaire.

Peu de données quantitatives sur la densité cellulaire des récepteurs hormonaux sont rapportées dans la littérature scientifique. Verney en 1954 (127) a estimé à 500 le nombre de molécules de vasopressine dans chaque cellule du tubule contourné distal, lorsque cette hormone exerce son action. Il est assez remarquable de constater que cette densité est très voisine de celle que nous avons pu mesurer par le nombre de molécules d'ocytocine [^{3}H] fixées sur les cellules épithéliales de la peau de grenouille. Si l'on suppose que les récepteurs sont uniformément répartis sur l'ensemble des cellules formant l'épithélium, on peut calculer qu'il y a entre 250 et 1 000 sites récepteurs par cellule. Si l'on suppose au contraire que les sites sont exclusivement localisés sur la membrane plasmique de l'assise cellulaire la plus interne, la densité des sites serait alors de 30 par $\mathring{A}^2$. Ces valeurs sont supérieures mais restent du même ordre de grandeur que celles obtenues par Lefkowitz et al (128) pour les récepteurs de l'ACTH situés sur les cellules corticosurrénaliennes. Ces auteurs ont estimé à 60 le nombre des sites spécifiques à haute affinité présents dans chaque cellule.

Nous avons trouvé sur les cellules épithéliales de la peau et de la vessie des amphibiens deux catégories de sites de fixation de l'ocytocine [^{3}H]. Seuls les sites à forte affinité peuvent être impliqués dans l'initiation de la réponse physiologique. La présence de deux catégories de sites récepteurs de l'angiotensine sur l'aorte isolée a été décrite par Baudouin et al (129). De même, Lefkowitz et al (128) ont pu mettre en évidence deux catégories de sites de fixation de l'ACTH sur les membranes plasmiques des cellules corticosurrénaliennes. Le rôle physiologique de ces sites à faible affinité reste à définir dans tous les systèmes hormonaux où ils ont été décrits. Il ne semble pas que leur présence soit générale. Sur les membranes plasmiques de rein de porc, nous n'avons trouvé qu'une seule catégorie de récepteurs spécifiques de la lysine-vasopressine.

Pour les hormones peptidiques exerçant leur action par l'intermédiaire de l'AMP cyclique et pour lesquelles on peut comparer de façon précise l'affinité apparente des récepteurs impliqués dans la réponse physiologique des cellules intactes, avec l'affinité des récepteurs présents dans les fractions membranaires et impliqués dans l'activation de l'adényl cyclase, on constate une différence parfois importante. Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte de la baisse d'affinité apparente des récepteurs observée lors du fractionnement cellulaire.

Si les récepteurs de réserve existent, l'affinité "apparente" déterminée sur le système intact par la concentration d'hormone donnant 50% de la réponse maximale est une surestimation de l'affinité réelle des récepteurs. Dans l'un des systèmes étudiés, les cellules épithéliales de la vessie de grenouille, l'existence de récepteurs de réserve est probable. En effet, la lysine vasopressine qui produit une activation maximale de l'adényl cyclase quatre fois inférieure à celle produite par l'ocytocine est néanmoins capable d'induire sur le système intact un effet hydrosmotique maximal de même intensité que celui de l'ocytocine.

Sur les systèmes acellulaires, il est possible que l'hydrolyse de l'hormone, ou la libération d'un inhibiteur compétitif puisse diminuer la concentration efficace de l'hormone au niveau des sites récepteurs.

Les ions, et en particulier le Ca^{++} doivent jouer un rôle très important dans la structure et le fonctionnement des membranes. Dans la cellule intacte, la membrane sépare deux milieux de composition ionique très différente. Cette assymétrie ionique est détruite lorsque les fragments de membranes sont isolés et étudiés in vitro.

Les résultats obtenus sur le système adényl-cyclasique des membranes plasmiques de rein de porc sensible à la lysine-vasopressine, nous permettent de penser que l'affinité "apparente" du récepteur pour l'hormone, déterminée à partir des courbes d'activation de l'adényl cyclase dépend des conditions expérimentales retenues par la mesure de cette activation. Nous avons pu montrer, pour la première fois à notre connaissance, que l'activation de l'adényl cyclase, comme la vitesse de formation du complexe HR , est très dépendante de la concentration hormonale. Dans de nombreux cas, l'activation de l'adényl cyclase a été mesurée par l'augmentation de la production d'AMP cyclique pendant des temps courts suivant l'addition d'hormone ; donc dans une condition où l'équilibre de fixation n'est pas atteint, en particulier pour les plus faibles concentrations d'hormone. Un tel protocole conduit à une sous-estimation de l'activation de l'adényl cyclase d'autant plus importante que la concentration d'hormone est plus faible et donc à une sous-estimation de l'affinité réelle du système pour l'hormone. L'affinité "apparente" du système adényl cyclasique des membranes plasmiques pour l'hormone, déterminée à partir des activités mesurées entre 15 et 20 minutes après l'addition de l'hormone, est de 3×10^{-10}M (voir fig.34). Elle est de 8×10^{-9}M si les mesures sont faites entre 0 et 5 minutes.

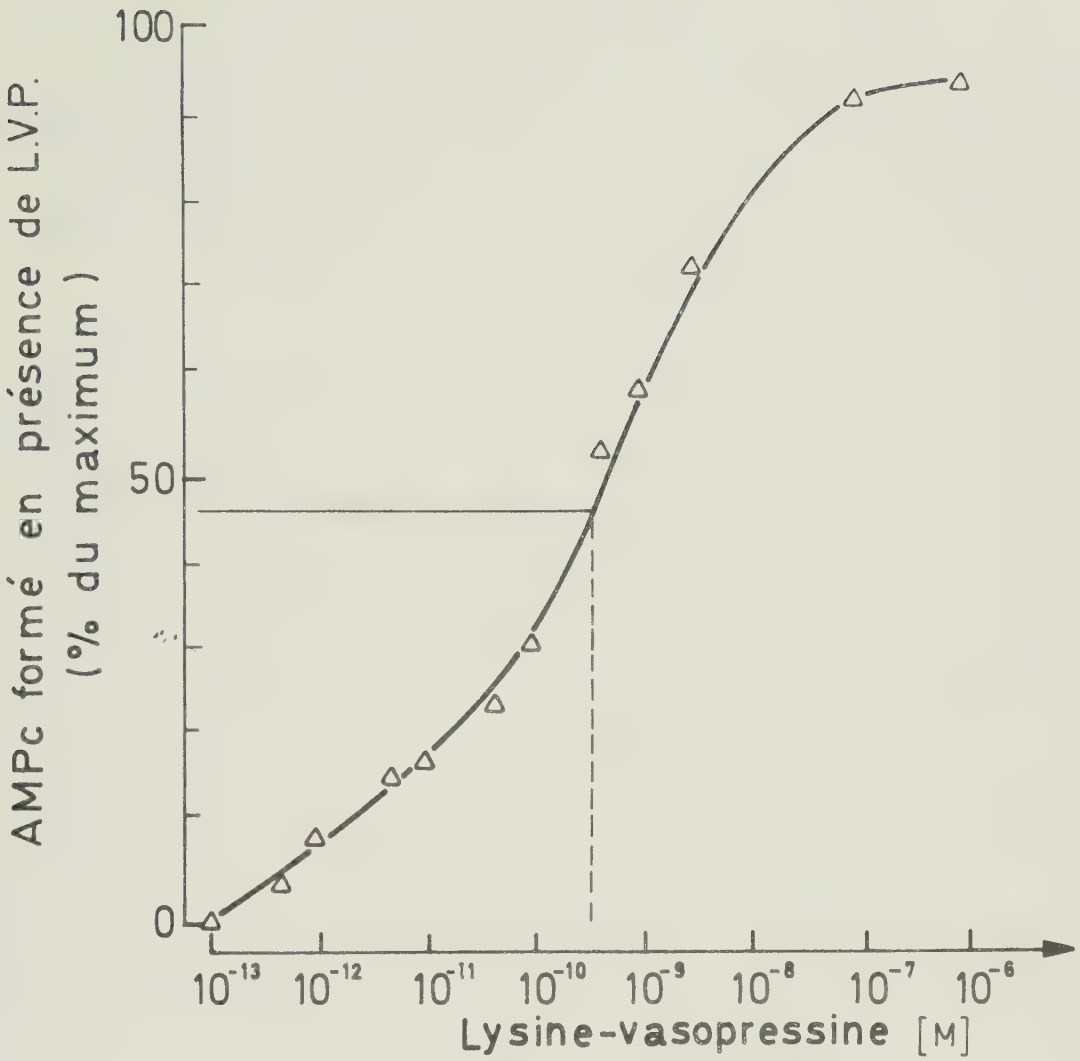


Figure 34 : ACTIVATION DE L'ADENYL CYCLASE DES MEMBRANES DE REIN PAR LA LYSINE-VASOPRESSINE

Les activités adényl-cyclasiques sont mesurées entre 15 et 20 minutes après l'addition de l'hormone. La stimulation de l'adényl cyclase est significative à 5×10^{-15} M de lysine-vasopressine dans le milieu.

Lorsqu'on mesure les activités adényl cyclasiques à l'équilibre, la stimulation hormonale est apparente à 5×10^{-13}M. Nous avons donc observé sur ce système une stimulation de l'adényl cyclase pour des concentrations de vasopressine du même ordre de grandeur que les concentrations d'hormone circulante. Chez le chien, Bonjour et Malvin (130) ont déterminé une concentration de vasopressine circulante de 9×10^{-13}M. Chez le chien conscient et privé d'eau pendant 12 h, la concentration atteint $1,7 \times 10^{-12}$M.

Pour une concentration hormonale donnée, il est possible d'établir une bonne corrélation entre la cinétique d'activation de l'adényl cyclase et la cinétique d'intéraction hormone-récepteur. Ce résultat indique que l'activation est fonction de la concentration du complexe hormone-récepteur et non pas de la fréquence des intéractions entre l'hormone et son récepteur comme le prévoit la "rate theory" de Paton (44). Toutefois, ces résultats n'excluent pas la possibilité que l'activation de l'adényl cyclase soit fonction de la fréquence de dissociation (réponse = k_{-1} [HR]). Il est intéressant de noter de ce point de vue, que sur les membranes plasmiques des hépatocytes, le GTP qui augmente la constante de dissociation du complexe formé entre le glucagon et son récepteur, augmente également la stimulation de l'adényl cyclase par l'hormone (131).

Tous les auteurs qui ont étudié les relations entre les récepteurs aux hormones polypeptidiques et l'adényl cyclase ont admis implicitement l'existence d'une relation linéaire entre l'intéraction hormone-récepteur et le stimulus qui en résulte, mesuré par l'activation de l'adényl cyclase. Nos résultats sur les membranes de rein de porc montrent que la fonction de couplage (relation entre la concentration du complexe hormone-récepteur et l'activation de l'adényl cyclase) est une fonction saturable. Cette donnée originale nous semble intéressante du point de vue des mécanismes qui assurent la transmission de l'information hormonale du récepteur à l'adényl cyclase. Elle pourrait signifier qu'il existe un "messager" entre le récepteur et l'adényl cyclase ; la

formation de ce messager étant une fonction saturable de la concentration du complexe hormone-récepteur. Il pourrait aussi s'interpréter en termes de coopérativité négative telle que l'ont définit Levitzki et Koshland (93). Supposons que le système adényl-cyclasique soit un polymère de sous-unités comportant un site récepteur pour l'hormone et un site catalytique, et que le site catalytique existe sous deux formes, l'une active et l'autre inactive, si la transition de la forme inactive vers la forme active du site catalytique d'une sous-unité peut être induite soit par l'occupation de son site régulateur par l'hormone, soit par la transition des sous-unités voisines, il est alors possible de rendre compte d'une activation importante pour un faible degré d'occupation des sites récepteurs. Du point de vue physiologique, un couplage non linéaire permet une modulation efficace de l'activité de l'adényl cyclase pour une faible occupation des récepteurs, c'est-à-dire pour des faibles concentrations d'hormone circulante.

Les résultats présentés dans cette thèse ont été en grande partie publiés (91,132, 133, 134, 135).

Je tiens à remercier très sincèrement Mademoiselle Martine Imbert, Messieurs Christian Roy, Rabary Rajerison pour l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de la préparation de cette thèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. WIRZ, H. (1956) Der osmotische Druck in den cortikalen Tubuli der Rattenniere. Helvet. Physiol. un pharmacol. Acta,14 : 353-362

2. GOTTSCHALK, C.W. et MYLHE, M. (1959) Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism : Evidence for the counter-current hypothesis. Amer. J. Physiol., 196 : 927-936

3. ULLRICH, K.J., RUMRICH, G. et FUCHS, G. (1964) Wasserpermeabilität und transtubulären Wasserfluss corticoler Nephronaleschnitte bei verschiedenen Diurezezuständen. Pflügers. Arch. ges. Physiol., 280 : 99-119

4. GRANTHAM, J.J. et BURG, M.B. (1966) Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. Amer. J. Physiol., 211 : 255-259

5. MOREL, F. (1967) Current concepts in renal physiology. In : Proceedings of the third international congress of nephrology, vol.1 p. 1-17. Edité par Basel Karger, sous la direction de J.S.Handler

6. JARD, S. (1966) Etude des effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la grenouille : Rana esculenta : analyse à l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour l'activité biologique. J.Physiologie (Paris) 58 : sup 15

7. FUHRMAN, F.A., et USSING, H.H. (1951) A characteristic response of the isolated frog skin potentiel to neurohypophyseal principles and its relation to the transport of sodium and water. J.Cell. Comp. Physiol., 38 : 109-130

8. LEAF, A. (1960) Some actions of neurohypophyseal hormone on a living membrane. J.Gen. Physiol., 43 : 175-189

9. MOREL, F. et JARD, S. (1968) Actions and functions of neurohypophyseal hormones and related peptides in lower vertebrates. Dans Handbook of experimental pharmacology. Edité par Springer Verlag, sous la direction de B.Berde, 23 : 655-716

10. JARD, S. (1971) Le mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique. J.Physiol., Paris, 63 : 99-146

11. DOUSA, T.P., WALTER, R., SCHWARTZ, I.L., SANDS, H. et HECHTER, O. (1972) Role of cyclic AMP in the action of neurohypophyseal hormones on Kidney. Advances in Cyclic Res. 1 : 121-135

12. LEAF, A., ANDERSON, J. et PAGE, L.B. (1958) Active sodium transport by the isolated toad bladder. J.Gen. Physiol., 41 : 657-668

13. BURG, M.B., GRANTHAM, J.J., ABRAMOW, M. et ORLOFF, J. (1966) Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. Amer. J. Physiol. 210 : 1293-1298

14. ORLOFF, J. et HANDLER, J.S. (1961) Vasopressin like effects of adenosine 3' - 5' - phosphate (cyclic 3' - 5' - AMP) and theophylline in the toad bladder. Biochem. Biophy. Research. Commun. 5 : 63-66

15. BABA, W., SMITH, A. et TOWNSEND, M. (1967) The effect of vasopressin, theophy lline and 3' - 5' - adenosine monophosphate (cyclic AMP) on sodium transport across the frog skin. Quart. J. exp. Physiol. 52 : 416-420

16. BASTIDE, F. et JARD, S. (1968) Actions de la noradrénaline et de l'ocytocine sur le transport actif de sodium et la perméabilité à l'eau de la peau de grenouille. Biochem. Biophys. Acta, 150 : 113-123

17. BROWN, E., CLARKE, D.L., ROUX, V. et SHERMAN, D.H. (1963) The stimulation of adenosine 3'-5'-monophosphate production by antidiuretic factors. J.Biol.Chem., 238, P.C. 852

18. GRANTHAM, J. et ORLOFF, J. (1968) Effect of prostaglandin E_1 on the permeability response of the isolated collecting tubule to vasopressin, adenosine 3'-5'-monophosphate and theophylline. J.Clin. Invest., 47 : 1154-1161

19. ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W. (1968) Cyclic AMP. Ann. Rev. Biochem., 37 : 149-174

20. ANDERSON, W.A.Jr et BROWN, E. (1963) The influence of arginine vasopressin upon the production of adenosine 3'-5'-monophosphate by adenylcyclase from the kidney. Biochim. Biophys. Acta 67 : 674-676

21. CHASE, L.R. et AURBACH, G.D. (1968) Renal adenyl cyclase : Anatomically separate site for parathyroid hormone and vasopressin. Science. 159 : 545-546

22. DOUSA, T. HECHTER, O., SCHWARTZ, I.L. et WALTER, R. (1971) Neurohypophyseal hormone - responsive adenylate cyclase from mammalian kidney. Proc. nat. Acad. Sci., 68 : 1693-1697

23. JAKOBS, K.H., SCHULTZ, K. et SCHULTZ, G. (1972) Hemmung von Adenyl-Cyclase-Präparationen aus der Rattenniere durch Calciumionen und verschiedene Diuretica. Naunyn-Schniedeberg. Arch. Pharmacol. 273 : 248-266

24. FORTE, L.R. (1972) Characterization of the adenyl cyclase of rat kidney plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta 266 : 524-542

25. DOUSA, T., HECHTER, O., WALTER, R. et SCHWARTZ, I.L. (1970) 8-Arginine vasopressinoic acid : inhibitor of rabbit kidney adenyl cyclase. Science. 167 : 1134-1135

26. BAR, H.P., HECHTER, O., SCHWARTZ, I.L. et WALTER, R. (1970) Neurohypophyseal hormone - sensitive adenyl cyclase of toad urinary bladder. Proc. nat. Acad. Sci., Wash.67 : 7-12

27. HYNIE, S. et SHARP, G.W.G. (1971) Adenyl cyclase in the toad bladder. Biochim. Biophys. Acta., 230 : 40-51

28. JARD, S. et BASTIDE, F. (1970) A cyclic - AMP dependent protein kinase from frog epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. comm. 39 : 556-559

29. KIRSCHBERGER, M., SCHWARTZ, I.L. et WALTER, R. (1971) Preparation and properties of cyclic 3'-5'-AMP dependent protein kinase activity in toad bladder epithelium. The Physiologist 14 : 172

30. KUO, J.F. et GREENGARD, P. (1969) Cyclic nucleotide dependent protein kinases. IV Widespread occurence of adenosine 3'-5'-monphosphate - dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc. nat. Acad. of Sci. 64 : 1349-1355

31. EDELMAN, I.S., PETERSEN, M.J. et GULYASSY, P.F. (1964) Kinetic analysis of the antidiuretic action of vasopressin and adenosine 3'-5'-monophosphate. J.Clin. Invest. 43 : 2185-2194

32. JARD, S., BASTIDE, F. et MOREL, F. (1968) Analyse de la relation dose-effet biologique pour l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur la peau et la vessie de la grenouille. Biochim. Biophys. Acta 150 : 124-130

33. MOREL, F. et JARD, S. (1963) Inhibition of frog (Rana esculenta) antidiuretic action of vasotocin by some analogues. Amer. J. Physiol. 204 : 227-232

34. EGGENA, P., SCHWARTZ, I.L. et WALTER, R. (1970) Threshold and receptor reserve in the action of neurohypophyseal peptides - A study of synergists and antagonists of the hydrosmotic response of the toad urinary bladder. J.Gen. Physiol., 56 : 250-271

35. JARD, S., RAJERISON, R.M. et MONTEGUT, M. (1970) Inhibition des effets de l'ocytocine sur la peau et la vessie de grenouille par l' (2-O-Ethyl-Tyrosine)-ocytocine. Biochim. Biophys. Acta, 196 : 85-94

36. BERDE, B. et BOISSONNAS, R.A. (1968) Basic pharmalogical properties of synthetic analogues and homologues of neurohypophyseal hormones. Dans Handbook of experimental pharmacology édité par Springer Verlag, sous la direction de B.Berde, 23 : 802-870

37. RUDINGER, J., PLISKA, V. et KREJCI (1972) Ocytocin analogs in the analysis of some phases of hormone action. Recent progress in hormone research 28 : 131-172

38. RODBELL, M., KRANS, H.M.J., POHL, S.L. and BIRNBAUMER, L.(1971) The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver III. Binding of glucagon : method of assay and specificity. J.Biol. Chem. 246 : 1861-1871

39. FREYCHET, P., ROTH, J. and NEVILLE, D.M.Jr (1971) Monoiodoinsulin : demonstration ofits biological activity and binding to fat cells and liver membranes. Biochem.Biophys.Res.Commun. 43 : 400-408

40. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J., PRICER, W.E., Jr et PASTAN, I. (1970) ACTH receptors in the adrenal : specific binding of ACTH-^{125}I and its relation to adenyl cyclase. Proc. nat. Acad. Sci., 65 : 745-752

41. THOMPSON, E.E., FREYCHET, P. et ROTH, J. (1972) Monoiodo-ocytocin : demonstration of its biological activity and specific binding to isolated fat cells. Endocrinology, 91 : 1199-1205

42. FONG, C.T.O., SILVER, L., CHRISTMAN, D.R. et SCHWARTZ, I.L. (1960) On the mechanism of action of the antidiuretic hormone (vasopressin). Proc. nat. Acad. Sci., 46 : 1273-1277

43. AGISHI, Y. et DINGMAN, J.F. (1965) Specific tritiation of ocytocin by catalytic deiodination. Biochem. Biophys.Res.Comm.,18 : 92-97

44. PATON, W.D.M. (1971) A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination. Proc. Roy. Soc. B. (London) 154 : 21-69

45. RAJERISON, R.M., MONTEGUT, M., JARD, S., et MOREL, F. (1972) The isolated frog skin epithelium : permeability characteristics and responsiveness to ocytocin, Cyclic AMP and theophylline. Pflügers. Arch., 233 : 302-312

46. USSING, H.H. (1963) Transport of electrolytes and water across epithelia. Harvey Lect., 59 : 1

47. RAWLINS, F., MATEU, L., FRAGACHAN, F., WHITTEMBURY, G. (1970) Isolated toad skin epithelium. Transport characteristics. Pflügers Arch., 316 : 64-80

48. ERLIJ, D., ACEVES, J. (1969) Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin. Biophys. J.9 : A 163

49. ACEVES, J., ERLIJ, D. (1971) Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin. J.Physiol. (London), 212 : 195-210

50. CARASSO, N., FAVARD, P., JARD, S. et RAJERISON, R.M. (1971) I Preparation and general structure in différent physiological states. Journal de Microscopie 10 : 315-330

51. USSING, H.H. et ZERAHN, K. (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short circuited isolated frog skin. Acta, physiol. Scand. 23 : 110-127

52. RAJERISON, R.M. (1970) L'assise épithéliale isolée de la peau de grenouille (rana esculenta). Etude de la régulation hormonale de ses propriétés de transport et de perméabilité. Thèse de doctorat de 3° cycle.Paris.

53. HAYS, R.M., SINGER, M.D.B. et MALAMED, S. (1965) The effect of calcium withdrawal on structure and function of the toad bladder. J.Cell. Biol.,25 : 195-208

54. EMMELOT, P., BOS, C.J., BENEDETTI, E. et RÜMKE, P.H. (1964) Studies on plasma membranes. I Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 90 : 126-145

55. RAMACHANDRAN, J. et LEE, V. (1970) Divergent effects of o Nitrophenyl Sulfenyl ACTH on Rat and Rabbit fat cell Adenyl Cyclases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 : 358-366

56. BRAY, G.A. (1960) Anal. Biochem. 1 : 279

57. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J.(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem., 193 : 265-275

58. KRISHNA, G., WEISS, B. et BRODIE, B.B. (1968) A simple, sensitive method for the assay of adenyl cyclase. J.Pharmacol. Exp. Ther., 163 : 379-385

59. COON, J.M. (1939) A new method for the assay of posterior pituitary extracts. Arch. Int. Pharmacodyn., LXII, fasc.1:79-99

60. WALTER, R. et HAVRAN, R.T. (1971) Arginine-vasopressin, Lysine-vasopressin and oxytocin, ^{14}C-Labelled in the glycine residue. Experientia 27 : 645 -646

61. HAVRAN, R.T., SCHWARTZ, I.L., EGGENA, P. et WALTER, R. (1971) Preparation of radioactive peptide hormones and some applications in biological studies. Intra-Science Chemistry. Reports 5 : 323-333

62. WILZBACH, K.E. (1957) Tritium-labelling by exposure of organic compounds to tritium gas. J.Am. Chem. Soc., 79 : 1013

63. SCHWARTZ, I.L., RASMUSSEN, H., SCHOESSLER, M.A., SILVER, L. et FONG, C.T.O. (1960) Relation of chemical attachment to physiolo-

gical attachment of vasopressin. Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 46 : 1288-1298

64. VIGNEAUD, V du, SCHNEIDER, C.H. (1962) Tritiation of oxytocin by the Wilzbach method and the synthesis of oxytocin from tritium labelled leucine. J.Am. Chem. Soc., 84 : 409-413

65. SJÖHOLM, I., CARLSSON, L. (1967) Synthesis of specifically tritium labelled oxytocin and lysine-vasopressin with high specific activity. J. of Labelled Comp. Vol.III : 3-16

66. HUGHES, W.L.,Jr et STRAESSLE, R. (1949) Preparation and properties of serum and plasma proteins. Iodation of human serum albumine. J.Am. Chem. Soc., 72 : 452-457

67. BRUNFELDT, K., HANSEN, B.A. et JORGENSEN, K.A. (1968) The immunological reactivity and biological activity of iodinated insulin, Acta, endocrin. 57 : 307-329

68. MORGAT, J.L., LAM THANG HUNG, CARDINAUD, R., FROMAGEOT, P. BOCKAERT, J., IMBERT, I. et MOREL, F. (1970) Peptidic hormone interactions at the molecular level - Preparation of highly labelled ^{3}H oxytocin. J.Label. Comp. 6 : 276-284

69. MORGAT, J.L., LAM THANG HUNG, PRADELLES, P., FERMANDJIAN, S. MENEZ, A., BOUET, F. et FROMAGEOT, P. (1972) Marquage radioactif des polypeptides hormonaux : ocytocine, arginine vasopressine, lysine vasopressine, angiotensine. I et II. Hormones pancréatiques, hormones de l'eau et des électrolytes. I n s e r m 1972, p. 361-384

70. STÜRMER, E. (1968) Bioassay for neurohypophyseal hormones and similar polypeptides. Dans Handbook of experimental pharmacology, édité par Springer Verlag, sous la direction de B.Berde 23 : 130-189

71. PRADELLES, P., MORGAT, J.L., FROMAGEOT, P., CAMIER, M., BONNE, D., COHEN, P., BOCKAERT, J. et JARD, S. (1972)

Tritium labelling of 8-lysine vasopressin and its purification by affinity chromatography on sepharose bound neurophysins. F e b s - Letters : 26 : 189-192

72. STADIE, W.C., HAUGAARD, N. et VAUGHAN, M. (1952) Studies of insulin binding with isotopically labeled insulin. J.Biol. Chem., 199 : 729-739

73. NEWERLY, K. et BERGSON, S.A. (1957) Lack of specificity of insulin - I^{131} - Binding by isolated rat diaphragm. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94 : 751-755

74. BOURGUET, J. et JARD, S. (1964) Un dispositif automatique d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. Biochim. Biophys. Acta, (Amst)88 :442-444

75. VAUGHAN, M. et MURAD, F. (1969) Adenyl cyclase activity in particles from fat cells. Biochemistry. 7 : 3092-3099

76. PARISI, M. RIPOCHE, P. et BOURGUET, J. (1969) Une préparation de l'épithélium de la vessie de grenouille. Réponses à l'ocytocine au 3'-5'-adénosine monophosphate cyclique et à la théophylline. PflUgers Arch. ges. Physiol., 309 : 59-69

77. JARD, S., MAETZ, J. et MOREL, F. (1960) Action de quelques analogues de l'ocytocine sur différents récepteurs intervenant dans l'osmorégulation de Rana esculenta. Compt.Rend.,251:788-790

78. BARTH, T., JARD, S., MOREL, F. et MONTEGUT, M. (1972) N -Carbamoyl-2-O-Methyltyrosine-oxytocin and 1-6 Deamino Cystathione-2-Moethyoltyrosine Oxytocin : Two antagonists of oxytocin on amphibian epithelial cell receptors. Experientia. 28 : 962-964

79. WILLUMSEN, N.B.S. et BIE, P. (1969) Tissue of plasma ratios of radioactivity in the rat hypothalamus-hypophyseal system after intraveneous injection of ^{3}H-Lysine-vasopressin and ^{3}H-Mannitol. Acta. endocrin. 60 : 389-400

89. WALTER, R. et du VIGNEAUD, V. (1966) 1-Deamino-1,6-L-Seleno-cystine-oxytocin, a highly potent isolog of 1-Deamino-oxytocin. J.Amer. Chem. Soc. 88 : 1331

90. ARIENS, E.J., VAN ROSSUM, J.M. et KOOPMAN, P.C. (1960) Receptor reserve and threshold phenomena - I. Theory and experiments with autonomic drugs tested on isolated organs. Arch. Int. Pharmaco. dyn. 127 : 459-478

91. BOCKAERT, J., ROY, C. et JARD,S. (1972) Oxytocin-sensitive adenyl cyclase in frog bladder epithelial cells. Role of calcium, nucleotides, and other factors in hormonal stimulation. J.Biol. Chem. 247 : 7073-7081

92. ATKINSON, D.E. (1966) Regulation of enzyme activity. Annual review of biochemistry. 35 : 85-124

93. LEVITZKI, A. et KOSHLAND, D.E.Jr (1969) Negative cooperativity in regulations enzymes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 62 : 1121-1128

94. BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. et RODBELL, M. (1969) Adenyl cyclase in fat cells. I Properties and the effects of adrenocorticotropin and fluoride. J.Biol.Chem., 244 : 3468-3476

95. DRUMMOND, G.I. et DUNCAN, L. (1970) Adenyl cyclase in cardiac tissue. J.Biol. Chem., 245 : 976-983

96. DRUMMOND, G.I., SERVERSON, D.L. et DUNCAN, L. (1971)Adenyl cyclase kinetic properties and nature of fluoride and hormone stimulation. J.Biol. Chem., 246 : 4166-4173

97. BENTLEY, P.J. (1958) The effects of neurohypophyseal extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad Bufo marinus. J.Endocr. 17 : 201-209

98. RASMUSSEN, H., SCHWARTZ, I.L., YOUNG, R. et MARC-AURELE (1963) Structural requirements for the action of neurohypophyseal

80. CAMPBELL, B.J., THYSEN, B. et CHU, F.S. (1965) Peptidase catalysed hydrolysis of antidiurectic hormone in toad bladder. Life Sci., 4 : 2129-2140

81. SOLOFF, M.S., SWARTZ, T.L. et SAFRAN, M. (1972) Specific uptake of radioactivity from ^{3}H-Oxytocin by surviving segments of mammary gland. Endocrinology, 91 : 213-216

82. EDELMAN, I.S., BOGOROCH, R. et PORTER, G.A. (1963) On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport : the role of protein synthesis. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50 : 1169-1177

83. FONG, C.T.O. SCHWARTZ, I.L., POPENOE, E.A., SILVER, L. et SCHOESSLER, M.A. (1959) On the molecular bonding of lysine vasopressin at its renal receptor site. J.Am. Chem. Soc. 81 : 2592-2593

84. FONG, C.T.O., SILVER, L., CHRISTMAN, D.R. et SCHWARTZ, I.L. (1960) On the mechanism of action of the antidiuretic hormone (vasopressin). Proc. nat. Acad. Sci.(Wash.) 46 : 1273-1277

85. SCHWARTZ, I.K., RASMUSSEN, H., SCHOESSLER, M.A., SILVER, L. et FONG, C.T.O. (1960) Relation of chemical attachment to physiological action of vasopressin. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46 : 1288-1298

86. SCHWARTZ, I.L. et RUDINGER, J. (1964) Activity of neurohypophyseal hormone analogues lacking a disulfide bridge. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 52 : 1044-1045

87. PLISKA, V., RUDINGER, J., DOUSA, T. et CORT, J.H. (1968) Oxytocin activity and the integrity of the disulfide bridge. Am. J. physiol. 215 : 916-920

88. HASE, S., MORIKAWA, T. et SAKAKIBARA, S. (1969) Synthesis of a biologically active analog of Deamino-8-arginine-vasopressin which does not contain a disulphide bond. Experientia 25 : 1239-1240

hormones upon the isolated amphibian urinary bladder. J.Gen. Physiol., 46 : 1171-1189

99. GULYASSY, P.F. et EDELMAN, I.S. (1965) Hydrogen-ion dependence of the antidiuretic action of vasopressin, oxytocin and deamino oxytocin. Biochim. Biophys. Acta, 102 : 185-197

100. BARTH, T., HÜTTER, H.J., PLISKA, V. et SORM, F. (1969) Inactivation of Deamino-oxytocine, Deamino-carba^{1}-oxytocine, D-Lys^{8} - and D-Arg^{8} vasopressins by kidney cell particles. Experientia, 25 : 646-647

101. DESBUQUOIS, B et CUATRECASAS, P. (1972) Independence of glucagon receptors and glucagon inactivation in liver cell membranes. Nature New Biology, 236 : 202-204

102. ILLIANO, G. et CUATRECASAS, P. (1972) Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by Insulin. Science, 175 : 906-908

103. KARLIN, A. (1963) The in vitro release by the toad bladder of an inhibitor of oxytocin. Biochem.Biophys.Res.Commun. 11 : 44-49

104. KARLIN, A. et OVERWERG, N.I.A. (1965) An inhibitor of oxytocin from the urinary bladder of the toad, Bufo marinus. Nature, 207 : 1401-1402

105. FERGUSON, D.R. et HELLER, H. (1965) Distribution of neurohypophseal hormones in mammals. J.Physiol.(Lond.)180 : 846-863

106. SAWYER, W.H. (1968) Phylogenetic aspects of the neurohypophyseal hormones. Handbook of Experimental Pharmacology - Springer Verlag 23 p. 717-747

107. POST, R.L. et SEN, A.K. (1967) Sodium and potassium - Stimulated ATPase - Methods Enzymol., 10 : 762-773

108. FLEISCHER, S. et FLEISCHER, B. (1967) Removal and binding of polar lipids in mitochondria and other membrane systems. Methods Enzymol., 10 : 406-433

109. RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. et KRANS, H.M.J. (1971) Regulation of glucagon action at its receptor. Dans Structure activity Relationship of Protein and Polypeptide Hormones. Excerpta Medica p. 199-211

110. NARDACCI, N., BORBERG, V. et CAMPBELL, B. (1972) Inactivation of Antidiuretic hormone by renal plasma membranes. Fed. Proc., 31 : 890

111. FITZPATRICK, D.F., DAVENPORT, G.R., FORTE, L. et LANDON, E.J. (1969) Characterization of plasma membrane proteins in mammalian kidney. I Preparation of a membrane fraction and separation of the protein. J.Biol. Chem., 244 : 3561-3569

112. HENRI, V. (1902) Lois générales de l'action des diastases. Herman, Paris.

113. MICHAELIS, L. et MENTEN, M.L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. 2, 49 : 333-369

114. RASMUSSEN, H., SCHOESSLER, M.A. et HOCHSTER, G. (1960) Studies on the mechanism of action of vasopressin. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 46 : 1278-1287

115. BOURGUET, J. -1966) Influence de la température sur la cinétique de l'augmentation de perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille sous l'action de l'ocytocine. J.Physiol.(Paris)58:476-477

116. BIRNBAUMER, L. (1972) Dissociation of hormone binding from hormone action. Dans Structure-Activity relationship of protein and polypeptide hormones. Excerpta Medica. Edité sous la direction de M.Margoulies et F.C.Greenwood, part 2. p.471-475

117. BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. et RODBELL, M. (1972) The glucagon-sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. VII Hormonal stimulation : reversibility and dependence on concentration of free hormone. J.Biol.Chem.247 : 2038-2043

118. PAIRAULT, J., LAUDAT, M.H. et LAUDAT, Ph. Epinephrine-receptor interactions in rat fat all membranes. Soumis au Biochemica Biophysica. Acta, communication personnelle.

119. CLARK, A.J. (1933) Mode of action of drugs on cells. Edward Arnold, Londres

120. ARIENS, E.J. (1966) Receptor theory and structure action relationship. Advanc. Drug. Res., 3 : 235-285

121. STEPHENSON, R.P. (1956) A modification of receptor theory. Brit. J. Pharmacol. Chemotherap., 11 : 379-393

122. WAUD, D.R. (1968) Pharmacological receptors. Pharmacological reviews., 20 : 49-88

123. BRAUN, T. et HECHTER, O. (1970) Glucocorticoid regulation of ACTH sensitivity of adenyl cyclase in rat fact cell membranes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 66 : 995-1001

124. WALSH, D.A., PERKINS, Y.P. et KREBS, E.G. (1968) An adenosine 3'-5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem., 243 : 3763-3765

125. YAMAMURA, H., KUMON, A. et NISNIZUKA, Y. (1971) Cross reactions of adenosine 3'-5'-monophosphate dependent protein kinase systems from rat liver and rabbit skeletal muscle. J.Biol. Chem., 246 : 1544-1547

126. HECHTER, O. et BRAUN, T.H. (1971) Peptide hormone-receptor interaction : an informational transaction. Dans Structure activity relationships of protein and polypeptide hormones. Part 1, p. 212-227 - Excerpta Medica, édité sous la direction de M. Margoulies et F.C. Greenwood.

127. VERNEY, E.B. (1954) Water diuresis. Irish J.Med. Sci.,6 : 377-402

128. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J. et PASTAN, I. (1971) ACTH-Receptor interaction in the adrenal : a model for the initial step in the action of hormones that stimulate adenyl cyclase. Ann. N.Y. Acad. Sciences., 185 : 195-208

129. BAUDOUIN, M., MEYER, P. et WORCEL, M. (1971) Specific binding of ^{3}H-AGIOTENSIN II in rabbit aorta. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42 : 434-440

130. BONJOUR, J.P. et MALVIN, R.L. (1970) Plasma concentrations of ADH in conscious and anesthetized dogs. Amer. J. Physiol. 218 : 1128-1132

131. RODBELL, M. (1972) The problem of identifying the glucagon receptor. Dans Hormones pancréatiques, Hormones de l'eau et des électrolytes. Inserm 1972 p. 301-315

132. BOCKAERT, J., JARD, S., MOREL, F. et MONTEGUT, M. (1970) Uptake of oxytocin ^{3}H by frog skin and bladder epithelial cells. Amer. J. Physiol., 219 : 1514-1521

133. BOCKAERT, J., IMBERT, M., JARD, S. et MOREL, F. (1972) ^{3}H-oxytocin binding sites in the isolated frog skin epithelium. Relation to the physiological response. Molec. Pharmacol., 8 : 230-240

134. ROY, C., BOCKAERT, J., RAJERISON, R. et JARD, S. (1973) Oxytocin receptors in frog bladder epithelial cells. Relationship of ^{3}H-oxytocin binding to adenylate cyclase activation. FEBS Letters, 30 : 329-334

135. BOCKAERT, J., ROY, C., RAJERISON, R. et JARD, S. (1973) Application de la théorie de l'occupation aux récepteurs rénaux de la lysine-vasopressine couplés à l'adényl cyclase. C.R. Acad. Sci. Paris, 276 : Série D 649-652